

WORLD
INTELLECTUAL
PROPERTY
ORGANIZATION



IP SERVICES

Home IP Services PatentScope Patent Search



Search result: 1 of 1

(WO/2001/035100) BINDING ACCELERATION TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF ANALYTES

Biblio. Data	Description	Claims	National Phase	Notices	Documents
--------------	-------------	--------	----------------	---------	-----------

Latest bibliographic data on file with the International Bureau

Publication Number: WO/2001/035100 International Application No.: PCT/US2000/031233
 Publication Date: 17.05.2001 International Filing Date: 13.11.2000
 Chapter 2 Demand Filed: 18.05.2001

Int. Class.: C12Q 1/68 (2006.01), G01N 33/543 (2006.01)

Applicant: CLINICAL MICRO SENSORS, INC. [US/US]; 757 S. Raymond Avenue Pasadena, CA 91105 (US).

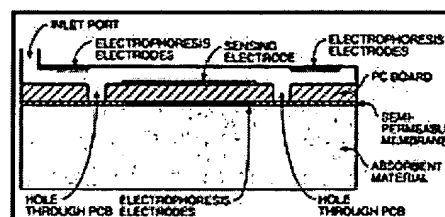
Inventors: BLACKBURN, Gary; 261 N. Lone Hill Avenue Glendora, CA (US).
 VIELMETTER, Jost, G.; 69 South Greenwood Avenue Pasadena, CA 91107 (US).
 KAYYEM, Jon, Faiz; 1000 Buena Vista Pasadena, CA 91030 (US).

Agent: TRECARTIN, Richard, F.; Flehr Hohbach Test Albritton & Herbert LLP 4 Embarcadero Center, Suite 3400 San Francisco, CA 94111-4187 (US).

Priority Data: 09/440,371 12.11.1999 US
 60/171,981 23.12.1999 US

Title: BINDING ACCELERATION TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF ANALYTES

Abstract: The invention relates to compositions and methods useful in the acceleration of binding of target analytes to capture ligands on surfaces. Detection proceeds through the use of an electron transfer moiety (ETM) that is associated with the target analyte, either directly or indirectly, to allow electronic detection of the ETM.



Designated States: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
 African Regional Intellectual Property Org. (ARIPO) (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW)
 Eurasian Patent Organization (EAPO) (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
 European Patent Office (EPO) (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)
 African Intellectual Property Organization (OAPI) (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publication Language:

English (EN)

Filing Language:

English (EN)

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-514227

(P2003-514227A)

(43) 公表日 平成15年4月15日 (2003.4.15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テロート* (参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 3	G 0 1 N 33/543	5 9 3 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	Z 2 G 0 5 2
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 1/22	B 4 B 0 2 9
G 0 1 N 1/22		33/483	F 4 B 0 6 3

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 208 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-536580(P2001-536580)
(86) (22) 出願日 平成12年11月13日 (2000.11.13)
(85) 翻訳文提出日 平成14年5月8日 (2002.5.8)
(86) 国際出願番号 PCT/US00/31233
(87) 国際公開番号 WO01/035100
(87) 国際公開日 平成13年5月17日 (2001.5.17)
(31) 優先権主張番号 09/440,371
(32) 優先日 平成11年11月12日 (1999.11.12)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(31) 優先権主張番号 60/171,981
(32) 優先日 平成11年12月23日 (1999.12.23)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

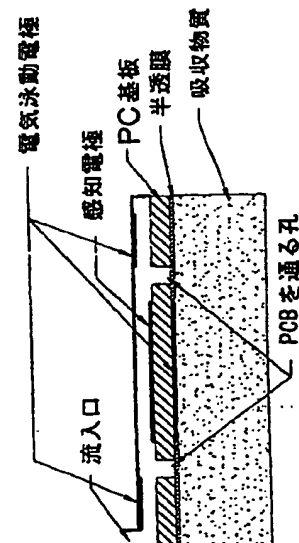
(71) 出願人 クリニカル・マイクロ・センサーズ・イン
コーポレイテッド
CLINICAL MICRO SENS
ORS, INC.
アメリカ合衆国91105カリフォルニア州バ
サディナ、サウス・レイモンド・アベニュー
757番
(72) 発明者 ゲイリー・ブラックバーン
アメリカ合衆国カリフォルニア州グレンド
ラ、ノース・ローン・ヒル・アベニュー
261番
(74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 被検体検出のための結合促進法

(57) 【要約】

本発明は、表面の捕獲リガンドへの標的被検体の結合促進に有用な組成物および方法に関する。電子伝達部分 (ETM) の電子的検出を可能とする、標的被検体と直接または間接的に関係しているETMを使用して、検出を推進する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板を含む構成物であって、該基板が、

- a) i) それぞれが共有結合により付着した捕獲リガンドを含む各検出電極のアレイ；
- ii) 少なくとも第1の電気泳動電極；
- を含む第1の表面；
- b) 少なくとも第2の電気泳動電極を含む第2の表面；および
- c) 該第1および第2の表面を連結する、少なくとも1つのチャンネル；
- を含むものである、構成物。

【請求項2】 該チャンネルが浸透層物質を含む、請求項1に記載の構成物

。

【請求項3】 該チャンネルが膜を含む、請求項1に記載の構成物。

【請求項4】 さらに検出チャンバーを含み、該検出チャンバーが該表面を含む、請求項1に記載の構成物。

【請求項5】 検出チャンバーを含む構成物であって、該検出チャンバーが

、

- a) i) 1) それぞれが共有結合により付着した捕獲リガンドを含む各検出電極のアレイ；
- を含む第1の表面
- ii) 第2の表面；
- iii) 該第1および第2の表面を連結する、少なくとも1つのチャンネル
- ；
- を含む基板；および
- b) 該第2の表面に接触している吸収物質
- を含むものである、構成物。

【請求項6】 該チャンネルが浸透層物質を含む、請求項5に記載の構成物

。

【請求項7】 該チャンネルが膜を含む、請求項5に記載の構成物。

【請求項8】 サンプル中の標的被検体を検出する方法であって、

a) 該標的被検体を検出チャンバー内で濃縮すること、但し、該検出チャンバーは

i) 1) それぞれが共有結合により付着した捕獲リガンドを含む各検出電極のアレイ；

2) 少なくとも第1の電気泳動電極；
を含む第1の表面；

ii) 少なくとも第2の電気泳動電極を含む第2の表面；および

iii) 該第1および第2の表面を連結する、少なくとも1つのチャンネル；
を含むものである；

b) 該標的被検体を該捕獲リガンドに結合させてアッセイ複合体を形成すること、
但し、該アッセイ複合体はさらに少なくとも1個の電子伝達部分（ETM）を含む；および

c) 該検出電極を用いて該ETMの存在を検出すること；
を含む方法。

【請求項9】 サンプル中の標的被検体を検出する方法であって、

a) 該標的被検体を検出チャンバー内で濃縮すること、但し、該検出チャンバーは

i) 1) A) それぞれが共有結合により付着した捕獲リガンドを含む各検出電極のアレイ；

を含む第1の表面；

2) 第2の表面；

3) 該第1および第2の表面を連結する、少なくとも1つのチャンネルを含む基板；および

ii) 該第2の表面に接触している吸収物質

を含むものである；

b) 該標的被検体を該捕獲リガンドに結合させてアッセイ複合体を形成すること、
但し、該アッセイ複合体はさらに少なくとも1個の電子伝達部分（ETM）を含む；および

c) 該検出電極を用いて該ETMの存在を検出すること；

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、1999年12月23日出願されたU. S. S. N. 60/171, 981、1999年11月12日出願された同09/440, 371、1999年6月23日出願された同09/338, 726、1998年8月14日出願された同09/134, 058、および1998年7月23日出願された同60/090, 389の継続出願である。これらのすべてを、出典明示により本明細書の一部とする。

【0002】

発明の分野

本発明は、表面の捕獲リガンドへの標的被検体の結合促進に有用な組成物および方法に関する。電子伝達部分（ETM）の電子的検出を可能とする、標的被検体と直接または間接的に関係しているETMを使用して、検出を推進する。

【0003】

発明の背景

液体または気体中の特異的な物質の存在および／または濃度を検出することについては、多くのアッセイまたはセンサーがある。これらの多くは、検出のためのメカニズムとして特異的なリガンド／抗リガンドの反応によっている。すなわち、対の物質（即ち、結合対やリガンド／抗リガンド）は、互いには結合するが、他の物質とはほとんどまたはまったく結合しないことが分かっている。多くの技術において複合体の検出にこれらの結合対が使用されてきた。一般的にこれらの方法は、複合体の1つの成分をなんらかの方法、例えば、放射性同位体、蛍光物質および他の光学活性分子、酵素などを用いて標識し、複合体全体を検出可能にして実施される。

【0004】

他のアッセイは検出に電子的シグナルを用いる。とくに興味深いのはバイオセンサーである。少なくとも2種のバイオセンサーが知られている。それらは酵素をベースとするかまたは代謝性のバイオセンサー、および結合性またはバイオ親和性センサーである。例えば、米国特許第4, 713, 347号、第5, 192

、507号、第4、920、047号、第3、873、267号およびこれらの特許に開示の文献参照。これらの既知センサーのいくつかは交流電流(AC)技法を利用しているが、この技法は、バルク（または誘導）インピーダンスの相違を検出することに限定される。

【0005】

続く検出用に、生体分子のその結合パートナーとの結合を助長するための、ミクロ流体工学の方法における電気泳動の使用は、既知である；例えば、米国特許番号第5、605、662、および第5、632、957、ならびにそれらの中で開示されている参考文献を参照のこと。

【0006】

同様に、電極を使用する核酸の電子検出も既知である；例えば、米国特許第5、591、578号、第5、824、473号、第5、705、348号、第5、780、234号および第5、770、369号；U. S. S. N. 08/911, 589；およびWO98/20162；PCT/US98/12430；PCT/US98/12082；PCT/US99/10104；PCT/US99/01705；およびPCT/US99/01703参照。

【0007】

バイオセンサー応用の重大な障害の一つは、標的被検体が検出表面に結合する速度と表面の親和性である。核酸への応用では結合速度を加速すること、あるいは検出表面でのサンプル濃度を上げることのために開発された多くの技法がある。それらの技法としては、核酸の沈殿（デタージェント添加を包含するEP0299442A1参照（Pontius et al., PNAS USA 88:8237 (1991) 参照）；液状2相系への核酸の分配（Albertsson et al., Biochimica et Biophysica Acta 103:1-12 (1965)；Kohne et al., Biocem. 16(24):5329 (1977)；および Mueller, Partitioning of Nucleic Acids, Ch. 7 in Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Academic Press, 1985 参照）、並びにマクロリガンド存在下の分配（Mueller et al., Anal. Biochem. 118:269 (1981)）；および核酸結合タンパク質の添加（Pontius et al., PNAS USA 87:8403 (1990)）および米国特許第5,015,569号参照）などを包含する。これらの文献を出典明示により本

明細書の一部とする。さらに、ある種タンパク質についての分配系も開発されているが、Gineitis et al., Anal. Biochem. 139:400 (1984) (出典明示により本明細書の一部とする) を参照されたい。

【0008】

しかし、核酸を含む標的被検体が引続く電子検出用の検出電極に結合するのを促進する組合わせシステムが必要である。

【0009】

(発明の要約)

上記に概説した目的に従い、本発明は、検出電極のアレイを含む第1の表面を含む基板を有する構成物を提供する。各検出電極はそれぞれ、共有結合により付着した捕獲リガンドおよび少なくとも第1の電気泳動電極を含む。該基板はまた、少なくとも第2の電気泳動の電極と、第1および第2の表面を連結する少なくとも1つのチャンネルを含む、第2の表面も有する。該チャンネルは、本明細書で概説する浸透層物質または膜を含んでもよい。

【0010】

さらなる態様では、本発明は、第1の表面を含む基板を有する検出チャンバーを含む構成物を提供する。第1の表面は、共有結合により付着した捕獲リガンドをそれぞれ含む検出電極のアレイを含む。該表面はまた、第2の表面および、第1および第2の表面を連結する少なくとも1つのチャンネルも含む。該検出チャンバーはまた、第2の表面に接触している吸収物質も含む。再度、該チャンネルは本明細書で概説する浸透層物質または膜を含んでもよい。

【0011】

さらなる態様では、本発明は、標的被検体を上記の検出チャンバー内で濃縮し、該標的被検体を捕獲リガンドに結合させてアッセイ複合体を形成させることを含む、サンプル中の標的被検体の検出法を提供する。該アッセイ複合体はさらに、少なくとも1つの電子伝達部分 (ETM) を含む。該方法は、検出電極を用いてETMの存在を検出することを含む。

【0012】

さらなる態様では、本発明はサンプル中の標的被検体の検出法を提供する。本

方法は、共有結合した捕獲リガンドを含む検出電極を含む検出チャンバー内で、標的被検体を濃縮することを含む。標的被検体は該捕獲リガンドに結合して、少なくとも1つの電子伝達部分 (E T M) を含むアッセイ複合体を形成する。次いで、 E T M の存在を検出電極により検出する。

【 0 0 1 3 】

さらなる態様において、該濃縮工程は、少なくとも1つの第1電極と少なくとも1つの第2電極間の電界であって、サンプルが検出電極に電気泳動輸送されるために十分な電界にサンプルを載置することを含む。

【 0 0 1 4 】

他の態様において、該濃縮工程は検出チャンバー内に少なくとも1種の容積排除剤を含ませることを含む。

【 0 0 1 5 】

さらなる態様において、該濃縮工程は標的被検体を沈殿させることを含む。

【 0 0 1 6 】

他の態様において、該濃縮工程は、標的被検体が一方の相に濃縮されるように、2つの分離可能な溶液相を形成する少なくとも2種の試薬を含ませることを含む。

【 0 0 1 7 】

さらなる態様において、該濃縮工程はシャトル粒子に標的被検体を結合させることを含む。

【 0 0 1 8 】

他の態様において、本発明は、アッセイ複合体の形成に至らしめる条件下で、共有結合した捕獲リガンドを含む検出電極を通過するようにサンプルを流動させることを特徴とする標的被検体の検出法を提供する。上記のように、アッセイ複合体はさらに少なくとも1つの電子伝達部分 (E T M) を含み、 E T M の存在は当該検出電極により検出する。

【 0 0 1 9 】

さらなる態様において、本発明は標的核酸検出のためのものであり、ハイブリダイゼーション促進剤の使用を含む。アッセイ複合体はハイブリダイゼーション

促進剤の存在下に形成されるが、該促進剤は核酸結合タンパク質または多価イオンである。

【 0 0 2 0 】

他の態様において、本発明は、アッセイ複合体の形成に至らしめる条件下で、共有結合した捕獲リガンドを含む検出電極にサンプルを加えることを特徴とする標的被検体の検出法を提供する。該条件は混合粒子の存在を包含する。

【 0 0 2 1 】

さらなる態様において、本発明は複数の金電極を含む基板を提供する。各金電極は、自己集合した単層、捕獲リガンド、および各電極が独立してアドレス参照可能となるような相互接続体を含む。好適な基板はファイバークラスなどのプリント回路基板物質などである。

【 0 0 2 2 】

他の態様において、本発明は、複数の金電極を含む基板の作製法を提供する。該方法はファイバークラス基板上に接着金属を被覆し、接着金属上に金を被覆することを含む。次いで、リトグラフィーにより型を形成するが、該型は複数の電極および連結した相互接続体を含む。該方法は選択肢として各電極に自己集合単層 (SAM) を付加することも包含する。

【 0 0 2 3 】

他の態様において、本発明は、複数の金電極を含む基板の作製方法を提供する。該方法は基板上に接着金属を被覆し、接着金属上に金を被覆することを含む。次いで、リトグラフィーにより型を形成するが、該型は複数の電極および連結した相互接続体を含む。該方法はさらに各電極に自己集合単層 (SAM) を付加することも包含する。

【 0 0 2 4 】

(図面の簡単な説明)

図1A、1B、1C、1D、1Eおよび1Fは2組の電極セット、電気泳動セットおよび検出セットの数種の代表的な形状を描出する。図1Aおよび1Bにおいて、基板30は第1電気泳動電極10を有し、該電気泳動電極10は電極から電氣的に離れたその上に、またはそこに埋め込んだ検出電極20を有する。そこ

にはサンプル受容領域40がさらに存在する。電気泳動と検出電極に対する対電極は示していない。図1Cは図1Aの側面図を表し、対極となる電気泳動電極50および任意なものとして対極となる検出電極60を加えてある。浸透層25も示す。当業者が認めるように、これらの対電極は、連続して用いるなら同じ電極であってもよい。図1D、1Eおよび1Fは個々の電気泳動電極の使用を描出する。図1Eは1Dの側面図である。図1Fは以下により詳細に説明するように、サンプルが1つの検出電極から他の電極に順次移動する構図を示す。

【0025】

図2はサンプルの空間的標的化ならびに結合速度を上げる「混合」用に多次元配列した電気泳動電極の使用を描出する。図2Aは電気泳動電極10と検出電極20を示す。電気泳動電極10と15の間に、また、同時に電気泳動電極12と17の間に加える電気泳動電圧が検出器電極20に標的被検体を推進させる。

【0026】

図3A、3Bおよび3Cは、標的核酸配列を電極に結合させる3つの好ましい実施態様を示す。図3Aは、結合リンカー106を介して連結する捕獲プローブ100にハイブリダイズする標的配列120を示す。それは本明細書で概略する通り、伝導性オリゴマーか絶縁体のいずれかとなり得る。電極105は、不動態化剤107の単層を含み、それは伝導性オリゴマー(本明細書中では108として示す)および/または絶縁体(本明細書中では109として示す)を含み得る。図に示した全実施態様に関するかぎり、nは少なくとも1である整数である。システムは捕獲プローブを全く利用しなくてもよいが(すなわち、nは0である)、当業者には明らかなように、このことは通常好ましくはない。nの上限は、標的配列の長さおよび必要な感度に依存する。図1Bは、標的配列120の第1部分にハイブリダイズする第1部分111および捕獲プローブ100にハイブリダイズする第2部分を有する単一捕獲伸長プローブ110の使用を示す。図1Cは、2つの捕獲伸長プローブ110および130の使用を示す。第1捕獲伸長プローブ110は、標的配列120の第1部分にハイブリダイズする第1部分111および補足プローブ100の第1部分102にハイブリダイズする第2部分112を有する。第2捕獲伸長プローブ130は、標的配列120の第2部分にハイ

ブリダイズする第1部分132および捕獲プローブ100の第2部分101にハイブリダイズする第2部分131を有する。当業者に明らかなように、これらの結合配置はいずれも図4、5および6の実施態様に使用し得る。

【0027】

図4A、4B、4Cおよび4Dはいくつかの可能なメカニズム-1のシステムを描出する。図4A、4Bおよび4Cはいくつかの可能な核酸システムを描出する。図4Aでは、検出プローブ140（捕獲プローブとしても作用する）が伝導性オリゴマー108を介して電極105に付着している。電極105はさらに不動態化剤107の単層を含む。標的配列120は検出プローブ140にハイブリダイズし、ETM135が付着する（標的配列または検出プローブの一方または他方に共有結合により、あるいは非共有結合により、すなわち、ハイブリダイゼーション指示体として）。図4Bでは、電極に対する図3Aの付着は、付着リンカー106により電極105に付着した捕獲プローブ100によって使用され、リンカー106は絶縁体または伝導性オリゴマーである。標的配列120は捕獲プローブおよび標識プローブ145にハイブリダイズし、標識プローブ145は第1部分141とリクルートリンカー142を含み、第1部分141は標的配列120の一部にハイブリダイズし、リクルートリンカー142は伝導性オリゴマー108を介して電極に付着している検出プローブ140にハイブリダイズする。図4Cは、第1捕獲伸長プローブ110を示してある以外、同様であるが、増幅プローブ150は第1部分151と第2部分152（増幅配列）を含み、第1部分151は標的配列120の第2部分にハイブリダイズし、第2部分152は標識プローブ145の第1部分141ハイブリダイズする。標識プローブ145の第2部分142は少なくとも1つのETM135を有する検出プローブ140にハイブリダイズする。図3Cは電極に対する図3Bの付着を利用する。図4Dは付着リンカー106を介して電極105に付着している捕獲結合リガンド160に結合した非核酸標的被検体165を描出する。溶液結合リガンド170も標的被検体に結合するが、これは少なくとも1つのETM135を有する検出プローブ140にハイブリダイズする核酸を含むリクルートリンカー171を含む。

【0028】

図5 A、5 B、5 C、5 D、5 E、5 F、5 Gおよび5 Hは、本発明の、核酸メカニズム-2のいくつかの態様を示す。核酸を表わす場合、同様に非核酸態様でを使用することができる。本明細書中で考察するように両者を種々異なる割合で用い得るし、また絶縁体は完全に欠失していてもよいのであるが、本明細書中に示したすべての単層では、伝導性オリゴマー108と絶縁体107の両方が、おおよそ1:1の割合で存在するように示している。加えて、当業者には明らかなように、これらのどの構造も、特定の標的配列を繰り返し得、すなわち、長い標的配列の場合、形成された多アッセイ複合体が存在し得る。加えて、図3の任意の電極結合態様は、任意のこれらシステムに使用され得る。

【0029】

図5 A、5 Bおよび5 Dは、ETM135を含む標的配列120を有し、本明細書において考察するように、これらは、例えば、ETMで修飾したヌクレオチドを用いるPCR反応の間に酵素学的に添加され得、標的配列を通して実質的にランダムに組込まれるか、または標的配列の末端に加えられる。図5 Cは、標的配列120の種々の部分にハイブリダイズする2種の捕獲プローブ100および100'の使用を示す。当業者には明らかなように、この実施態様で2つの捕獲プローブの5'-3'方向は異なる。

【0030】

図5 Cは、標的配列120に直接ハイブリダイズする標識プローブ145の使用を示す。図5 Cは、標的配列120の部分にハイブリダイズする第1部分141、ETM135を含む第2部分142を含む標識プローブ145の使用を示す。

【0031】

図5 E、5 Fおよび5 Gは、標的には直接ハイブリダイズしないが、むしろ、直接的(図5 E)または間接的(図5 Fおよび5 G)に標的配列にハイブリダイズする増幅プローブにハイブリダイズする標識プローブ145を用いるシステムを示す。増幅プローブ150を用いる図5 Eは、標的配列120にハイブリダイズする第1部分151および標識プローブの第1部分141にハイブリダイズする少なくとも1つの第2部分152、すなわち、増幅配列を有する。図5 Fは同様に

ある。但し、標的配列120にハイブリダイズする第1部分161および増幅プローブ150の第1部分151にハイブリダイズする第2部分162を含む第1標識伸長プローブ160を用いる。増幅プローブ150の第2部分152は、標識プローブ140の第1部分141にハイブリダイズし、それはETM135を含むリクルートリンカー142をも含む。図5Gは、第2標識伸長プローブ170を加え、標的配列120の部分にハイブリダイズする第1部分171および増幅プローブの部分にハイブリダイズする第2部分を有する。

【0032】

図5Hは、多標識プローブを利用するシステムを示す。標識プローブ140の第1部分141は、リクルートリンカー142のすべてまたは一部にハイブリダイズし得る。

【0033】

図6A～6Hは可能な非核酸メカニズム-2の態様のいくつかを描出する。図6Aでは付着リンカー106によって電極105に結合した捕獲結合リガンド200を利用する。標的被検体205は捕獲結合リガンド200に結合し、そしてETM135を含むリクルートリンカー220を有する溶液結合リガンド210に結合する。図6Bは、捕獲結合リガンド200が第2結合パートナー相互作用、例えば、核酸を用いる表面に付着する以外、同様の事例を描出する；捕獲結合リガンドの部分201が表面上の捕獲プローブ100に結合するか、またはハイブリダイズする。図6Cでも第2結合相互作用、例えば、核酸相互作用を利用し、シグナルを増幅する。この場合、溶液結合リガンド210は、標識プローブ230の第1部分231に結合またはハイブリダイズする第1部分220を含む。標識プローブ230もリクルートリンカーである第2部分232を含む。図6Dは6Aと同様の態様を描出するが、ここでは第2溶液結合リガンド240を使用する。図6Eは1を越える捕獲結合リガンド（200および200'）が使用される事例を描出する。図6Fは標的の添加が結合リガンドのコンホメーションを変化させ、リクルートリンカーが単層表面の近位に位置するようになったコンホメーションを示す。図6Gは候補バイオ活性物質のスクリーニングに本発明を使用する例を示し、薬物候補を標的に加えて、溶液結合リガンドを解離させ、シグ

ナルを消失させる例を示す。さらに、溶液結合リガンドは他の表面に付加して結合するが、それを酵素について図6 Hに一般的に示す。図6 Hは酵素がリクルートリンカーを含む基板を切断してシグナルの消失を招く用例を描出する。切断された断片はさらなる電極に付加し、シグナルを増大するが、これはメカニズム-1またはメカニズム-2のいずれかを用いている。

【0034】

図7 A、7 B、7 C、7 Dおよび7 Eは標識プローブとETM付着の異なる可能な構成を描出する。図7 A～Cでは、リクルートリンカーは核酸である；図7 Dおよび7 Eでは、核酸ではない。A＝ヌクレオシド置換；B＝塩基への付着；C＝リボースへの付着；D＝リン酸エステルへの付着；E＝塩基、リボースまたはリン酸エステル（または他の主鎖類似体）に付着したメタロセン・ポリマー（図に示すとおりであるが、同様に他のETMのポリマーであってもよい）；F＝塩基、リボースまたはリン酸エステル（または他の主鎖類似体）を介して付着した樹枝状構造；G＝塩基、リボースまたはリン酸エステル（または他の主鎖類似体）を経た、「分枝」構造を介しての付着；H＝メタロセン（または他のETM）ポリマーの付着；I＝樹枝状構造を介した付着；J＝標準的リンカーを用いる付着。

【0035】

図8 Aおよび8 Aは技術上既知の「分枝」点ホスホラミダイトを用い、核酸に同時に多数のETMを付加する代替法を図示するものである。当業者が認めるように、各終末点は相当数のETMを含むことができる。

【0036】

図9は「分枝」点ヌクレオシドを用いて複数のETMを核酸に同時に取り込ませる合成について図示したものである。

【0037】

図10はETMポリマーの付加を可能とする「分枝」点（この場合はアデノシン）の合成を描出する。

【0038】

図11は予め形成されたSAMに、一級アミンで機能化した核酸を付加させる

ために活性化カルボン酸エステルを使用した図を描出する。

【0039】

図12は代表的なヘアピン構造を描出する。500は標的結合配列、510はループ配列、520は自己相補性領域であり、530は検出プローブに実質的に相補的であり、530は「粘着末端」、すなわち、プローブの他の部分にハイブリダイズせず、ETMを含む部分である。

【0040】

図13A、13B、13Cおよび13Dは本発明のある実施態様を描出する。

【0041】

図14は実験例の結果を描出する。

【0042】

図15A、15B、15C、15D、15E、15Fおよび15Gは、2電極システムのいくつかの可能な配置を描写している。側面図15Aでは、電気泳動電極10の上に置かれた基板30が、検出電極20を含んでいる。該基板30には、中に孔またはチャンネルがある。本明細書で描写するすべてのチャンネルに関して、該チャンネルは浸透層物質25で満たされている場合がある；あるいは、透析膜のような膜を、チャンネルのどちらの末端でも使用し得る。アガロース、アクリルアミドなどの浸透層物質は、電気泳動のためのイオンは通過させるが、標的被検体のようなサンプルの成分が浸透層に入るのを防ぐものであることが好ましい。しかし、当業者に了知されるであろうように、これらのチャンネルは開放することができ、従って緩衝液で満たすことができる。逆電極50は、どこにでも配置できる。電気泳動電極10と逆電極50との間に電界を起こすことによって、該サンプルは検出電極の近傍に移る。図15Bは同様の設定を示すが、電気泳動電極10は、浸透層と直接は接していない；むしろ、イオン性伝導性物質27を用いる；好ましい実施態様では、緩衝液を利用する。図15Cは、「非対称的」配置を描写し、逆電極50が検出電極のアレイの片側にあり、チャンネルが他方にある。図15Dは同様であるが、「対称的」である。図15Eは、2組の電気泳動電極を使用する；このことにより、電極51と11を用いる、ある期間にわたって泳動可能な第1の電気泳動工程に続いて、電極52と12を用

いる第2の電気泳動工程を行えるようになる。図15Fと15Gは基板30の平面図を描写する；他の電気泳動電極が基板のもう一方の側にあり、示されていない。この実施態様では、検出電極（群）20がチャンネルを取り囲み、場合によっては浸透層25で満たされている。従って、図15Fには1個のチャンネルがあり、検出電極はチャンネルの周りに配置されている。図15Gには、中にチャンネルを有する各パッドがある。

【0043】

図16A、16B、16Cは、図15のシステムに似たシステムを描写する。これらのシステムでは電気泳動を用いるよりも、むしろ容積排除剤に似た吸収物質か、または電気泳動と吸収物質の組合せを使用して、ハイブリダイゼーションの促進を成し遂げる。図16Aでは、サンプルをチャンバー40内に導入し、液体をチャンネル（場合によっては浸透層で満たされている）を通して吸収物質500を含むチャンバー中に流すようにする。図16Bは別の配置を示し、ここではサイズ排除隔壁（例えば、半透膜）が基板（例えば、PC基板）の表面上にある。図16C、16D、16Eおよび16Fは、吸収物質と電気泳動の使用を組合せる様々な配置を描写する。当業者に了知されるであろうように、このシステムを他のハイブリダイゼーション促進技法と共に用いてもよい。

【0044】

（発明の詳細な説明）

本発明は、電極上での電気化学的検出に基づき、生物学的標的被検体の種、例えば、核酸およびタンパク質などの検出に有用な方法と構成物を目的とする。技術上知られるように、バイオセンサー、特に核酸検出用バイオセンサーの重大な障害の一つは、溶液ベースの標的が表面結合捕獲リガンドに結合する速度（すなわち、核酸の場合はハイブリダイゼーション）である。例えば、Gingeras et al., Nucl. Acid Res. 13:5373 (1987)（全文を出典明示により本明細書の一部とする）参照。このことに多くの方法で影響を与え得る；例えば、（1）標的被検体を表面付近で濃縮させ、大量の標的被検体が捕獲リガンドに効果的に結合するようにする方法；（2）良好な流動または「混合」を可能とするシステムを設定し、再度、大量の標的被検体が捕獲リガンドに結合するようにする方法；または

(3) 核酸の場合に、ハイブリダイゼーション促進剤を用い、標的配列と捕獲プローブを含むアッセイ複合体のハイブリダイゼーション速度を事実上上げる方法などである。これら3つの方法は、すべて本明細書において時には結合またはハイブリダイゼーションの促進というが、これらの技法のいくつかは事実上結合の速度定数を増大させるものではなく、濃度を増大させることによるか、または輸送量を向上させることにより、単位時間当たりの標的被検体の結合量を増加するものである。このように、本発明は所定の単位時間内に表面に結合する標的分子の数を増大させる構成物と方法の使用を目的とする。本明細書にて概説した多くの技法を核酸により一般的に例示したが、当業者はこれらの技法すべてがタンパク質などの他の標的被検体にも適用し得ることを認めるものである。

【0045】

このように、本発明はアッセイ複合体形成の速度を増大するため、または所定時間内にアッセイ複合体の数を増加させるために使用し得る多くの技法について記載するが、この場合の標的被検体は電極表面上の捕獲リガンドと会合することになる。これらの技法は以下の技法を含むが、これらに限定されるものではない：電気泳動輸送；容積排除剤の使用；核酸結合タンパク質の使用（核酸標的被検体の場合）；多価イオンの使用；沈殿剤；分配法；相適合性の調整；流動パラメーターの構築；「シャトル」または「ミキサー」としての微粒子の使用（磁性および非磁性粒子両方を含む）；温度勾配の使用；フィルターの使用；およびその組み合わせ。

【0046】

従って、本発明はサンプル溶液中の標的被検体を検出する方法を提供する。当業者が認めるように、サンプル溶液は以下の相当数の対象物を含むがこれらに限定されるものではない：体液（例えば、血液、尿、血清、リンパ液、唾液、肛門および膺分泌液、汗および精液などであるが、これらに限定されるものではなく、実質的に生体からのもの、好ましくは哺乳動物のサンプル、特にヒトのサンプルであることが好ましい）；環境サンプル（例えば、空気、農業、水および土壌の各サンプルなどであるが、これらに限定されるものではない）；生物学的戦闘剤サンプル；研究サンプル（すなわち、核酸の場合、サンプルは増幅反応の産物

であってもよく、例えば、PCRまたはSDA増幅反応など、PCT/US 99/01705に一般的に記載されているような標的およびシグナル増幅のサンプルを含む) ; 精製したサンプル、例えば、精製したゲノムDNA、RNA、タンパク質など ; 粗製サンプル (バクテリア、ウイルス、ゲノムDNAなど) 。当業者が認めるように、サンプルについては実質的にどのような実験的取扱いもなし得る。

【0047】

本方法は標的被検体の検出を目的とする。本明細書での「標的被検体」またはその文法的等価物とは、検出すべき分子または化合物を意味する。以下に概説するように、標的被検体は、好ましくは、結合リガンドに結合するが、それについては以下により詳細に説明する。当業者が認めるように、大多数の被検体は本方法により検出することが可能である ; 基本的に、それに対応する下記の結合リガンドを作製し得るあらゆる標的被検体を、本発明の方法によって検出することができる。

【0048】

電気泳動を使用する場合、以下により詳細に説明するように、標的被検体は、好ましくは、帯電しており、すなわち、実験条件下で正味の電荷をもち、その結果、電界において電気泳動的に輸送され得る。しかし、非帯電標的被検体は、帯電した結合パートナーまたは結合リガンドが該標的被検体と会合すれば利用可能となる。例えば、以下により詳細に説明するように、ある種の標的被検体、例えば、タンパク質が殆どまたは全く正味の電荷をもたない場合、可溶性の結合リガンドを用い、標的被検体に結合させETMおよび/または帯電種を追加的に含ませることができる ; ある態様において、ETMは帯電していてもよく、その結果、電気泳動と検出を容易にし得る。

【0049】

適切な被検体は有機および無機分子であり、生体分子を包含する。好適な態様において、被検体は以下のとおりである : 環境汚染物 (害虫駆除剤、殺虫剤、毒素などを含む) ; 化学物質 (溶媒、有機物質などを含む) ; 治療剤分子 (治療および誤用薬物、抗生物質などを含む) ; 生物分子 (ホルモン、サイトカイン、タ

ンパク質、脂質、炭化水素、細胞膜抗原およびレセプター（中性、ホルモン性、栄養性、および細胞表面レセプター）またはそれらのリガンドなどを含む）；全細胞（原核細胞（病原性バクテリアなど）および哺乳動物腫瘍細胞を含む真核細胞などを含む）；ウイルス（レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、レンチウイルスなどを含む）；および孢子など。特に好適な被検体は環境汚染物、核酸、タンパク質（酵素、抗生物質、抗原、成長因子、サイトカインなどを含む）、治療および誤用薬物、細胞、およびウイルスなどである。

【0050】

特に好適な標的被検体はタンパク質および核酸である。本明細書にて使用する際の「タンパク質」とはタンパク質、ポリペプチドおよびペプチドである。該タンパク質は天然産アミノ酸とペプチド結合から造られているか、または合成ペプチド模倣構造であってもよい。その側鎖は（R）または（S）いずれの立体配置であってもよい。好適な態様において、アミノ酸は（S）またはL-配置である。非天然の側鎖を用いる場合、非アミノ酸置換基を用い、例えば、生体内での分解を防止または遅延させることができる。

【0051】

本明細書で「核酸」または「オリゴヌクレオチド」またはそれらの文法的均等物は、一緒に共有結合されている少なくとも2個のヌクレオチドを意味する。本発明の核酸は一般にホスホジエステル結合を含むが、場合によっては、下記で概説されている通り、交互の主鎖を有し得る核酸類似体が含まれ、例えばホスホルアミド (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49 (10) :1925 (1993) およびそれに記載された参考文献, Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970), Sprinzl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977), Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14: 3487 (1986), Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984), Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988), および Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 (1986)), ホスホロチオエート (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991), および米国特許第5 6 4 4 0 4 8号)、ホスホロジチオエート (Briue et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321 (1989)、O-メチルホスホルアミダイト連鎖 (Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Ox

ford University Press 参照)、およびペプチド核酸主鎖および連鎖 (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114: 1895 (1992)、Meier et al., Chem. Int. Ed. Engl.、31: 1008 (1992)、Nielsen, Nature, 365: 566 (1993)、Carisson et al., Nature 380: 207 (1996)参照、これら全てを引用して説明の一部とする) が含まれる。他の類似核酸には、鍵付き (locked) 核酸を含む二環式構造 (Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc. 120:13252-3 (1998))、正の主鎖 (Denpcy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6097 (1995))、非イオン性主鎖 (米国特許第 5 3 8 6 0 2 3 号、第 5 6 3 7 6 8 4 号、第 5 6 0 2 2 4 0 号、第 5 2 1 6 1 4 1 号および第 4 4 6 9 8 6 3 号、Kiedrowski et al., Angew. Chem. Intl. Ed. English, 30: 423 (1991)、Letsinger et al., J. Am. Chem. Soc., 110: 4470 (1988)、Letsinger et al., Nucleoside & Nucleotide, 13: 1597 (1994)、2 および 3 章、ASC シンポジウムシリーズ 5 8 0、"Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y.S. Sanghui および P. Dan Cook 編、Mesmaeker et al., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 4:395(1994)、Jeffs et al., J. Biomolecular NMR, 34:17(1994)、Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)) および非リボース主鎖を伴うもの、例えば米国特許第 5 2 3 5 0 3 3 号および第 5 0 3 4 5 0 6 号、および 6 および 7 章、ASC シンポジウムシリーズ 5 8 0、"Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Y.S. Sanghui および P. Dan Cook 編記載のものがある。また、1 個またはそれ以上の炭素環状糖類を含む核酸も核酸の定義内に含まれる (Jenkins et al., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169-176 参照)。いくつかの核酸類似体は、Rawls, C & E News June 2, 1997 page 25 に報告されている。これらの参考文献は全て特に引用して説明の一部とする。リボース-リン酸主鎖にこれらの修飾を加えることにより、ETM の付加が簡易化され、または生理学的環境における上記分子の安定性および半減期が増加され得る。

【0052】

当業界の技術者が認めるように、これらの核酸類似体は全て本発明で使用され得る。さらに、天然に存する核酸および類似体の混合物が製造され得る。例えば、伝達性オリゴマーまたは ETM 結合部位では、類似構造が使用され得る。別法

として、異なる核酸類似体の混合物、および天然核酸および類似体の混合物も製造され得る。

【0053】

特に好ましいのは、ペプチド核酸類似体を含むペプチド核酸（PNA）である。天然に存する核酸の高荷電ホスホジエステル主鎖とは対照的に、これらの主鎖は中性条件下では実質的に非イオン性である。これによって、2つの利点が得られる。まず、PNA主鎖は、改善されたハイブリダイゼーション反応速度論を示す。PNAでは、誤対合対完全適合塩基対において融解温度（ T_m ）がより大きく変化する。DNAおよびRNAは、内部誤対合の場合典型的には T_m の2-4℃降下を呈する。非イオン性PNA主鎖の場合、降下は7-9℃に近い。これは不一致をよりよく検出することを可能とする。同様に、それらの非イオンの性質故に、これらの主鎖に結合された塩基のハイブリダイゼーションは、塩濃度に対して比較的非感受性である。

【0054】

核酸は、明記されている通り1本または2本鎖であるか、または2本鎖または1本鎖の両配列の部分を含み得る。核酸は、DNA、ゲノム性およびcDNAの両方、RNAまたはハイブリッドであり得、その場合核酸はデオキシリボースおよびリボースヌクレオチドの任意の組み合わせ、並びにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニンなどを含む塩基の任意の組み合わせを含む。好ましい態様は、米国特許第5681702号で総括的に記載されている通り、非特異的ハイブリダイゼーションを低減化するために、標的配列ではなく、他のプローブと相補的になるように設計された核酸においてイソシトシンおよびイソグアニンを用いる。ここで使用されている、「ヌクレオシド」の語は、ヌクレオチド並びにヌクレオシドおよびヌクレオチド類似体、および修飾ヌクレオシド、例えばアミノ修飾ヌクレオシドを包含する。さらに、「ヌクレオシド」は、非天然的類似構造を包含する。すなわち、例えば各々塩基を含む、ペプチド核酸の個々の単位は、ここではヌクレオシドと称される。

【0055】

好適な態様において、本方法は検出電極の近傍に標的被検体を濃縮することを含む。検出電極構成物の説明を以下に記載する。当業者が認めるように、サンプル中の標的被検体の開始濃度は、使用するサンプルのタイプにより大きく変わり得る。一般に、サンプル中の標的被検体の開始濃度は比較的低く、好適な技法としては、検出電極の近傍に標的被検体を濃縮することを可能とする方法を利用する。

【0056】

一般に、「濃縮」とは、標的被検体が表面に結合するために移動しなければならない有効な拡散距離が減少することを意味する。好適な態様において、検出電極での、またはその近傍での濃度は開始サンプルでの濃度よりも高い。これは様々な方法で、直接に、または結合促進の関数として間接的に測定し得る。すなわち、好適な態様において、濃度が少なくとも2倍に増加することが好ましく、少なくとも5倍であることが特に好ましく、さらに少なくとも10倍に増加することがとりわけ好ましい。当業者が認めるように、濃度の増加は同様に開始サンプルサイズに依存し、従って、非常に大きな濃度の増加、例えば、100倍、1,000倍および10,000倍（またはそれ以上）の増加が望ましい。ハイブリダイゼーションの速度が濃度の指標として用いられる場合、単位時間当たりの検出電極に結合する標的被検体濃度は少なくとも2倍以上増加することが好ましく、少なくとも5倍であることが特に好ましく、さらに少なくとも10倍に増加することがとりわけ好ましい。さらに、より高い増加が一部の態様において好ましい。

【0057】

本明細書に概説するように、様々な適切な濃縮法が存在する。好適な態様において、濃縮化は電気泳動により実施する。一般に、そのシステムは以下のように説明される。第1電極と第2電極を用い、輸送を果たす電界を生成させる；一般に、標的被検体種の電気泳動輸送が検出電極でその濃度を増加させるが、該電極は標的被検体を（直接または間接的に）結合する共有結合した捕獲結合リガンドを有する。この方法において、標的被検体はその捕獲リガンドに結合する反応速度は、捕獲リガンドを取囲む媒体中の標的被検体の濃度を増加させ、かつ、所定

の標的被検体分子が結合リガンドを見つけるために拡散しなければならない距離を減少させることで、顕著に増大する。

【0058】

検出電極は第1電極と同じであっても同じでなくてもよい。すなわち、一態様において、表面に被検体を輸送することとなる電界の生成に使用される電極は、検出に使用される電極とは異なる；すなわち、2組の電極があり、当業者の認めることであるが、この2組は電極、例えば、対極を共有する。他の態様において、電気泳動輸送および検出に使用される電極は同一であってもよい；すなわち、電極は1組のみ存在する。ある種態様において、標的被検体を引き付ける電気泳動電極は浸透層を含むが、浸透層は電極表面に標的被検体が接近するのを制限するように働き、被検体が電気化学的に分解するのを防止する。

【0059】

検出プローブ近傍へのこの電気泳動輸送は、標的被検体が検出プローブ表面またはその近傍で濃縮されることを可能にする；検出プローブ表面は捕獲結合リガンドを含み、それが標的被検体に結合してアッセイ複合体を形成する。一部の態様においては、複数の電気泳動電極を連続的にまたは同時に使用することで多次元電気泳動を可能とする。すなわち、溶液を標的とし、さらに結合の反応速度を上げるために検出電極の近傍で「混合」または「攪拌」する。以下に説明するように、アッセイ複合体はETMを含み、そのETMを検出電極により検出する。

【0060】

多くの電気泳動工程が使用し得ることも留意すべきことである；例えば、このシステムの成分を連続的に添加することが可能であり、各添加に続いて電気泳動工程により試薬を検出電極に輸送する。同様に、電気泳動を用いて「洗浄」工程を実施することが可能であり、その場合、過剰の試薬（非結合標的分子または非結合の余分の結合リガンド成分など）またはサンプルの他の成分（例えば、非相補性核酸）は検出電極から排除される。このように、電気泳動工程はいずれかを組合わせて使用することができる。さらに、電気泳動工程の時間が変更可能である。

【0061】

本発明の方法と構成物は2組の電極に依存することもあり、その場合、1組は電気泳動用として使用し、第2の組は検出に使用するか、あるいは以下に一般的に説明するように、1組を電気泳動と検出の両方に作用するように機能する電極とすることができる。

【0062】

標的被検体を含むサンプルを、少なくとも第1および少なくとも第2の電気泳動電極の間の電界内に置く。本明細書での「電極」は、電子装置に接続したとき、電流または電位を感知し、それをシグナルに変換し得る構成物を意味する。あるいは、電極を、電位を電子に適用し得る、および/または、溶液中の種へまたは種から電子を移し得る構成物として定義することができる。このように、電極とは下記のETMである。好適な電極は技術上既知であり、これらに限定されるものではないが、ある種の金属およびその酸化物、例えば、金、白金、パラジウム、シリコン、アルミニウム；金属酸化物電極、例えば、酸化白金、酸化チタン、酸化スズ、酸化スズインジウム、酸化パラジウム、酸化けい素、酸化アルミニウム、酸化モリブデン (Mo_2O_6)、酸化タングステン (WO_3) および酸化ルテニウム；および炭素（ガラス状電極、黒鉛およびカーボンペースト）などを包含する。好適な電極は金、白金、けい素、炭素および金属酸化物電極などであり、金が特に好ましい。

【0063】

本明細書に記載の電極は平らな表面として図示しているが、これは電極の可能な一形状であって、図式化を目的とするのみのものである。電極の形状は使用される検出法により変わる。例えば、平面状の電極は光検出法に好適であり、あるいは、核酸のアレイが作成され、従って合成および検出のためにアドレス可能な位置が必要な場合に好適である。あるいは、伝導性オリゴマーと内部表面に結合した核酸を含むSAMの場合には、単一プローブ分析のために、電極をチューブの形状とすることができる。電極コイルまたはメッシュも、いくつかの実施態様では同様に好ましい。これは、核酸に接触する表面領域を、少量のサンプルに最大限露出させるのを可能にする。

【0064】

当業者に了知されるであろうように、電極は様々な方法で配置される。好ましい実施態様では、電気泳動は当分野で周知のように互いに入り込み得る。さらに、異なる電極（例えば検出電極と電気泳動電極）は、同じかまたは異なる金属であり得る；例えば、該電気泳動電極は白金であり得、検出電極は金であり得る。

【0065】

さらに、以下により詳細に説明するように、検出電極はサンプル全体と電極との接触が最大となるように、または混合を可能とするように構成することができる。

【0066】

好適な態様において、電気泳動電極の一方（もしくは双方）または基板中のチャンネルは、米国特許第5,632,957号および第5,605,662号（両特許全文を出典明示により本明細書の一部とする）に一般的に記載されているように、浸透層を含む。この層はシステムを高電圧で行う場合、すなわち、水での加水分解が起こる場合に特に有用である。この浸透層は中間的分散層として働き、一般に細孔制限性を有していて、それが標的被検体、反応物などが電極表面と物理的に接触するのを阻害または妨害し、電気化学的悪影響に対し防御する。この浸透層は以下の種々の物質で形成されるが、これらに限定されるものではない：炭素鎖ポリマー、炭素-ケイ素鎖ポリマー、炭素-リン鎖ポリマー、炭素-窒素鎖ポリマー、ケイ素鎖ポリマー、ポリマー合金、重層化ポリマー複合体、浸透性ポリマー物質、セラミック、制御多孔性ガラス、ゾルーゲルとして形成される物質、エーロゲルとして形成される物質、アガロース、アクリルアミド、ヒドロゲルとして形成される物質、多孔性黒鉛、クレイまたはゼオライト。特に好適なのは、アクリルアミドと架橋剤とから形成されるメッシュ型ポリマーであり、トリエチレン・グリコール・ジアクリレート、テトラエチレン・グリコール・ジアクリレートおよびN, N'-メチレン-ビスアクリルアミドなどであるが、これらに限定されるものではない。

【0067】

好ましい実施態様では、電気泳動電極および/またはチャンネルは、伝統的な浸透層物質ではなく、むしろ伝導性の物質、特に電氣的重合が可能なポリマーで

ある物質を含む。この実施態様では、電気泳動電極の表面上にポリマーを重合させることによって電気泳動電極を作製する。これらの電氣的重合が可能な物質の利点は、重合した物質の厚さを制御かつ変更できることである；例えば、物質の1つの単層を作成でき、あるいは数ミクロンの厚さに及ぶ層を作成できる。さらに、電気泳動電極の表面上に、ポリマーを非常に特異的に局在させることが可能である。

【0068】

適する電氣的重合が可能なモノマーには、ピロール（ポリピロール層になる；出典明示により本明細書の一部とする Brajter-Toth, Anal Chem. 66:2458-2464 (1994) 参照）、アニリン（ポリアニリン層になる）、フェノール（ポリフェノール層になる）、アズレン、ピレンおよびカルバゾール（出典明示により全体を本明細書の一部とする Hino et al., Synthetic Metals 64:259 (1994) 参照）が含まれるが、これらに限定されるものではない。特に好ましい物質はポリピロールである。なぜなら、これは伝導性に関して興味深い特性を有するためである。ピロールの過酸化によって、伝導性のポリマーを、分子認識特質を有する絶縁体に変換できる。

【0069】

好ましい実施態様では、イオン隔膜またはゾルーゲル成分を、電気泳動電極を保護するために使用できる。Anal. Chem., 72:1835 (2000) 参照、出典明示により本明細書の一部とする。この実施態様では、核酸（または他の標的被検体）が膜またはゲルに実際に入り得る（例えば、それらは捕らえられる、あるいは集められる）。さらに、これに続いて緩衝液交換の工程を行い得る。

【0070】

電界は第1および第2電気泳動電極の間に生成される。「第1」および「第2」という用語は実質的に相互入れ替えが可能であり、何ら空間的または配座的区別を与えることを意味するものではないが、一般的に本明細書で使用する場合、第1電極は一般に空間的に検出電極に最も接近した電極である（2組の電極を使用する場合）か、あるいは第1電極は一般に検出電極として描出される（1組のみの電極を使用する場合）。当業者が認めるように、相当数の可能な電気泳動電

極の構成が、図 1、2 および 15 に一般的に描出したように使用可能である。一般に、2 つの型の構成、すなわち、バルク電気泳動と標的化電気泳動とがある。

【0071】

好適な態様においては、バルク電気泳動の構成が使用される。すなわち、図 1 A、1 B および 1 C に一般的に示すように、1 組の電気泳動電極を使用する。第 1 電気泳動電極（図 1 において 10）は一般に検出電極よりも大きく、空間的には検出プローブが電気泳動電極により生成される電界内にくるように配置される。電極間に直流電圧を印加することにより、電界が生じ、その結果、帯電した標的被検体が検出プローブの近傍に電気泳動輸送されることになる。これは必ずしも標的被検体を直接検出プローブ上に置くものではなく、検出表面での有効な拡散距離の縮小と有効な濃度上昇が、検出プローブ表面上の捕獲結合リガンドに結合する標的被検体の反応速度を上昇させるが、その場合、拡散は 3 次元よりもむしろ本質的に 2 次元で起こる必要がある。

【0072】

好適な態様において、標的化電気泳動の構成は、図 1 D、1 E および 1 F に一般的に示すように使用する。この態様においては、最も一般的なこととして、被検体を特異検出電極に対し特異的に標的化するために使用する複数の電気泳動電極が存在するが、常にそういう組み合わせというわけではない。これは基本的な 2 つの方法の一方で実施する。好適な態様においては、図 1 F に一般的に描出するように、また、米国特許第 5,605,662 号（出典明示により本明細書の一部とする）に記載されている構成部分のように、各検出電極は随伴した電気泳動電極をもつ。このように、電気泳動電極セット間に連続的にまたは同時に電圧を印加することにより、標的被検体が一方の検出電極から他方へ移動することになる。核酸などの負に帯電した標的被検体をさしあたり仮定すると、このシステムは図 1 F のシステムを用いて以下のように実施することができる。一態様において、電界は陽極 50 と陰極として作動する電気泳動電極 10 との間に生じ、アニオン標的被検体混合物を電気泳動電極 10 と検出電極 20 の両方に運ぶが、ここでは標的被検体混合物中の一種の結合が起こり得る。次いでその電界が遮断され、新たな電界が今度は陽極として作動する電気泳動電極 10 と、陰極として作

動する電気泳動電極 1 1 との間に形成される。これは非結合アニオン種を 1 0 から 1 1 に運び、そこで標的被検体の 2 つ目の種が結合し得る。この電界が切断され、新たな電界が 1 1 (陽極として作動) と 1 2 (陰極として作動) との間に生じ、非結合標的被検体を新たな検出電極に移動させる (以下同様)。このタイプの方法の利点は、標的被検体集団全体を実質的に各捕獲リガンドに輸送し、その結果、捕獲リガンドに結合する機会のある標的被検体数を最大化することである。

【0073】

別法として、各パッドでの電気泳動は (負に帯電した標的被検体集団と仮定して) 陽極 5 0 と陰極 1 0、1 1、1 2 および 1 3 との間に生じた電界により同時に実施することができる。これは迅速ではあるが、各検出電極に標的被検体の 4 分の 1 のみが「提示される」結果となる (4 つのパッドと仮定すれば)。これは態様によっては望ましいことでもあり、望ましくないことでもある ; 例えば、感度よりもむしろスピードが重要な場合である。

【0074】

好適な態様においては、関連するが異なるタイプの標的化電気泳動が実施される。この態様において、複数組の電気泳動電極が三次元様式で配置され、標的被検体が異なる位置に移動するのを可能とする。例えば、図 2 に示すように、電気泳動電極を三次元に配列して使用すると、サンプル溶液を特定の位置、すなわち、個々の検出電極または検出電極のセットに局在化させることが可能となる。このように、例えば、図 2 を参照すると、電気泳動電極 1 0 および 1 5、また同時に電気泳動電極 1 2 および 1 7 の間に印加された電気泳動電圧が標的被検体を検出電極 2 0 に移動させることができる。

【0075】

あるいは、好適な態様においては、複数の電気泳動電極を使用し、特定の位置に特異的に標的化するのではなく、むしろ連結された捕獲リガンドをもつ検出電極の近傍でサンプルを「混合」または「攪拌」することにより、結合反応速度を上げる。例えば、図 2 に示すように、最初の電気泳動工程は電気泳動電極 1 8 と描出していない第 2 の電気泳動電極との間で実施し、標的被検体を検出プローブ

表面に移動させる、すなわち、上記の「バルク電気泳動」である。次いで、それぞれのパルスを含む電圧、直流または交流電圧をさらなる電気泳動電極のセット間に印加し、標的被検体を輸送し、検出電極上に固相化した捕獲結合リガンドに対する標的被検体の利用能と結合反応速度を増加させることができる。同様に、図15Eに示すように、2セットの電気泳動電極を違う時間に使用して、標的被検体を検出プローブの表面にもたらすことができる。

【0076】

印加される電界の強度は多くの因子、例えば、これらに限定されるものではないが、電気泳動の所望の時間、サンプルのサイズ（すなわち、標的被検体が移動しなければならない距離）、溶液の組成（すなわち、電気活性帯電担体の存在または不存在とその酸化還元電位）、成分組成（すなわち、電気化学ポテンシャルに対する本発明の特定成分の安定性）、溶液中の電気活性帯電担体の存在または不存在、チャンバーのサイズ、標的被検体の電荷、電極のサイズと位置、電極物質、などにより決定される。

【0077】

一般に、直流電圧は最初の電気泳動に対し印加され、可能であれば、混合のために直流または交流パルスまたは電界が加えられる。

【0078】

印加される電界強度はシステムの他の構成要素に一部左右される。例えば、電極1組のみが使用され、チオール結合がシステムの構成要素を検出電極に結合させるために使用（すなわち、不動態化剤と伝導性オリゴマーを検出電極に付着させること；詳細は下記のとおり）されている場合には、印加される電気泳動電圧はチオール化合物の酸化電位以下、すなわち、一般には1V未満である。あるいは、より高い電圧を用い得るが、その場合チオール結合は用いない。同様に、2組の電極を使用する場合、すなわち、感受性の化学物質を含む検出電極が高電圧に曝されない場合には、チオール結合をより高い電界強度で使用することが可能である。

【0079】

このように、一般に、電気泳動電圧は1mVないし約2Vの範囲であり、当業

者も認めるであろうが、必要な電圧は所望の稼動時間、被検体の正味の電荷、バッファの存在または不存在、電極の位置、などに左右される。技術上知られているように、電気泳動速度は $\mu(d\Phi/dx)$ であり、式中の μ はイオン移動度である。1組の電極の実施態様には、電気泳動電圧は約50mVないし約900mVの範囲であり、好ましくは約100mVないし約800mVであり、特に好ましいのは約250mVないし約700mVである。2組の実施態様にとって、電気泳動電圧は約100mVないし約2Vまたはそれ以上の範囲であり、好ましくは約500mVないし約1.5Vであり、特に好ましいのは約1Vないし約1.5Vである。勿論、当業者が認めるように、これらの電圧は被検体の電荷に応じて陽性であっても陰性であってもよい。

【0080】

低電圧、すなわち、1.23V（標準の水素電極を基準として）未満の電圧、水による加水分解が起こる電圧未満、を用いる場合には、溶液中に電気活性物質を含ませることが必要であり、その結果、電流が電極から溶液に流れ、溶液中に電界が形成され得る。電気活性種のタイプと濃度は、電圧、電気泳動に必要とされる時間の長さ（必要とされる距離に関係する、すなわち、サンプル容量）などと共に変化する。好適な態様において、電気活性種の酸化還元電位は検出に使用するETMの電位よりも高い。例えば、酸化還元電位が300mVの電気活性電荷担体を使用し、該ETMの酸化還元電位が100mVであるならば、電気泳動は300mVで実施し、それに続く検出は100mVで実施することが可能であり、電気活性種を除く必要はない。

【0081】

当業者が認めるように、広範囲の適切な電気活性電荷担体を使用することが可能であり、その例は以下のとおりであるが、これらに限定されるものではない：水性 FeCl 、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ およびフェロセンとその誘導体を包含する鉄化合物； $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{pyr}$ および $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}$ を包含するルテニウムの複合体； $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ および $\text{Co}(\text{tris})\text{bpy}^{3+}$ などを包含するコバルトの複合体； $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ および $\text{Os}(\text{tris})\text{bpy}$ と誘導体を包含するオスミウムの複合体； $\text{Rh}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$ を包含するレニウム

の複合体；およびヨウ素 I_3^- 。技術上知られるように、一部の酸化還元反応は固形物を生成する（すなわち、可逆的な対はない）。一般に、これらの種は好ましくはないが、一部の事例では検出電極が可溶性反応の場合に使用し得る。このように、例えば、 $Ag/AgCl$ 反応は、 $AgCl$ 反応が陽極で起こるので、核酸と共に使用してもよい。酸化還元分子の濃度は変化するが、当業者も認めるように、飽和点またはそれ以下の濃度が有用である。この態様において、電気活性電荷担体を使用する場合、電気泳動に際し、システムを混合または攪拌することが必要であることもまた留意すべきである。

【0082】

電気泳動を利用するいかなるシステムでも、特にアレイ・ベースのシステムでも電気活性電荷担体を使用し得ることが留意されるべきである。例えば、電気活性電荷担体は、米国特許第5,532,129号、第5,605,662号、第5,565,322号および第5,632,957号、およびその関連出願（これらすべてを出典明示により本明細書の一部とする）に記載されているような電気泳動アレイシステムで使用し得る。

【0083】

サンプルを電界に設置し、1つ以上の検出電極に対して電気泳動輸送を実施する。検出電極の構成物は電気泳動電極について上記したとおりであるが、金、シリコン、炭素、白金および金属酸化物の電極が特に好ましい。

【0084】

好適な態様において、検出電極は基板上に形成する。さらに、本明細書における検討は一般的に金電極の形成に向けられているが、当業者も認めるように、他の電極も同様に使用し得る。基板は、当業者も認めるように、多様な物質を含むが、プリント回路基板（PCB）物質がとりわけ好ましい。このように、一般的に、適切な基板はこれらに限定されるものではないが、ファイバークラス、テフロン、セラミック、ガラス、シリコン、雲母、プラスチック（アクリル、スチレンと他の物質とのポリスチレンおよびコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリカーボネート、ポリウレタン、テフロン（商標）、およびその誘導体など）、GETEK（プロピレンオキシドとファイバークラスの

混合物) などである。

【0085】

一般に、好適な物質はプリント回路基板物質である。プリント回路基板物質は伝導層で被覆されている絶縁基板を含む物質であり、リトグラフィー技法、特に露光リトグラフィーにより処理加工して、電極と相互接続体の型を形成する(場合により技術上、相互接続またはリード線という)。絶縁基板はすべてというわけではないが、一般にポリマーである。技術上知られているように、1層または複数層を使用し、「二次元」基板(例えば、すべての電極および相互接続体が同一平面にある)または「三次元」基板(この場合、電極は1方の表面にあり、相互接続体が基板を貫通して他側へ出てもよい)を作製する。三次元システムは多くの場合、穿孔またはエッチングを使用し、次いで、銅などの金属で電気メッキし、「貫通基板」相互接続を作製するようにする。回路基板物質はしばしば基板にすでに付着した銅箔などの箔を備えており、必要により(例えば、相互接続のために)、例えば、電気メッキによりさらに銅が加えられる。銅の表面は、次いで、粘着層の付着を可能にするために、例えば、エッチングによりざらつかせる必要がある。

【0086】

一部の態様において、ガラスは基板として好ましくない場合がある。

【0087】

従って、好適な態様において、本発明は複数の電極、好ましくは金電極を含む基板を含むバイオチップ(場合により本明細書では「チップ」という)を提供する。電極数はアレイについて概説したとおりとする。各電極は、好ましくは、本明細書に概説したように自己集合した単層を含む。好適な態様において、単層形成種の1つは本明細書に概説したように捕獲リガンドを含む。さらに、各電極は相互接続をもち、それが一端で電極に付着し、最終的に電極を制御し得る装置に付着している。すなわち、各電極は独立してアドレス参照可能である。

【0088】

該基板はより大きな装置の部分であってもよく、該装置は検出電極に一定容量のサンプルを暴露する検出チャンバーを含む。一般に、検出チャンバーは約1 n

Lないし1mlの範囲であり、好ましくは約10 μ Lないし500 μ Lである。
当業者が認めるように、実験条件およびアッセイによっては、より少量またはより大量を用いてもよい。

【0089】

一部の態様において、検出チャンバーと電極は電極構成要素（交流／直流電圧源、電流計、プロセッサ、読み出しディスプレイ、温度制御器、光源など）を含む装置内に配設し得るカートリッジの部分である。この態様において、各電極からの相互接続は、装置内にカートリッジを挿入することにより、電極と電子組成間の接続が確立するような位置に配置する。

【0090】

回路基板物質（または他の基板）上の検出電極は一般に多様な方法で調製される。一般に、高純度の金を用い、真空蒸着法（スパッタリングおよび蒸発）または溶液析出（電気メッキまたは無電解方法）により被覆してもよい。電気メッキを実施する場合には、基板はまず伝導性物質を含まねばならない；ファイバークラスの回路基板は多くの場合銅箔を備えている。多くの場合、基板によっては、良好な機械的安定性を保証するために、基板と金の間に粘着層が用いられる。このように、好適な態様では、粘着金属、例えば、クロム、チタン、チタン／タングステン、タンタル、ニッケルまたはパラジウムなどの析出層を利用するが、これらの金属は上記金同様に析出させ得る。電気メッキ金属（粘着金属または電極金属）を使用する場合、粒状精製添加物（多くの場合、業界では光沢剤という）を任意に加えて、表面析出性を変化させる。好適な光沢剤は有機物および無機物の混合物であり、コバルトとニッケルが好ましい。

【0091】

一般に、粘着層は約100Åから約25ミクロン（1,000マイクロインチ）の厚さである。もし粘着金属が電気化学的に活性であるならば、電極金属は「染み出し」を防止する厚さで被覆しなければならない；もし粘着金属が電気化学的に不活性であるならば、電極金属は薄くてもよい。一般に、電極金属（好ましくは金）は約500Åから約5ミクロン（200マイクロインチ）の範囲の厚さで、好ましくは約30マイクロインチないし約50マイクロインチの厚さで析出

させる。一般には、金を析出させて、直径約5ミクロンないし約5mmの範囲、好ましくは約100ないし250ミクロンのサイズの電極とする。このようにして形成される検出電極は、好ましくは、清浄にし、以下に検討するようにSAMを付加する。

【0092】

このように、本発明は複数の金電極を含む基板の作製法を提供する。この方法はまず基板上に、ニッケルまたはパラジウムなどの粘着金属を（選択肢として光沢剤と共に）被覆することを含む。電気メッキが好ましい。次いで、電極金属、好ましくは金を粘着金属上に（好ましくは再度電気メッキにより）被覆する。次いで、電極とそれに繋がる相互接続を含む装置の型をリトグラフ技法、特に技術上既知の露光リトグラフィー技法、および湿式化学エッチングにより作製する。多くの場合、非伝導性化学抵抗性絶縁物質、例えば、蠟マスクまたはプラスチックを露光リトグラフィー技法により敷き、露光した電極とリード線への接続点のみを残す；リード線はそれ自体一般に被覆されている。

【0093】

本方法ではSAMの付加が続く。好適な態様においては、点滴析出技法を用い、必要な化学物質、すなわち、単層形成種であって、その一つは、好ましくは捕獲リガンド構成種、などを付加する。点滴析出技法は「スポット」アレイ作製について周知である。これは各電極に異なる構成物を付加するために実施する。すなわち、異なる捕獲リガンドを含む配列を作製する。あるいは、SAM種は各電極について同一であってもよく、この場合は点滴析出技法またはその溶液に基板全体もしくは基板表面を浸漬する方法により実施してもよい。

【0094】

好ましい実施態様では、検出電極を通過するサンプルの流動が最大になるようにシステムを配置する。図15に一般的に描写するように、このことを可能にする様々な方法がある。好ましい実施態様では、中にチャンネルまたは穴（これらは本明細書で孔またはバイア（via）とも呼ばれる）がある基板上に検出電極を配置する。電気泳動電極を、この基板の反対側に置く。電界の導入により、サンプルは検出電極を通過して移動し、かくしてより高いハイブリダ

イゼーション反応速度がもたらされる。

【0095】

当業者に了知されるであろうように、電気泳動電極の配置は変化し得る。好ましい実施態様では、検出電極と少なくとも1つの電気泳動電極を基板の第1の表面に置き、そして少なくとも第2の電気泳動電極は基板の第2の表面にある（一般的な平面の基板を想定している；当業者に了知されるであろうように、他の配置もまた可能である）。あるいは、検出チャンバーの表面が電気泳動電極を含み得る；つまり、これらの電極を基板から離して、基盤の他の側に置くことが可能である。さらに、本明細書で一般的に概説するように、複数の電気泳動電極を使用できる。

【0096】

好ましい実施態様では、これらのチャンネルは、電気泳動を遂げるためにイオンは通過させるが、標的被検体は通過させない物質で満たされる。例えば、チャンネルは、本明細書で定義する浸透層物質で満たされる。

【0097】

好ましい実施態様では、ゲル様物質の利用よりも、むしろチャンネルの一端または両端に膜を置く。好ましくは、この膜は、電気泳動を遂げるためにイオンの動きは可能にするが、標的被検体は通過させず、従って標的被検体を検出電極の近傍に濃縮する。

【0098】

好ましい実施態様では、ハイブリダイゼーションの促進は、システムの配置と吸収物質の組合せを用いて達成される。この実施態様では、図16に一般的に描写するが、検出チャンバーは2つのサブチャンバーを有し、これらは一般的にゲル基質または膜などのサイズ排除隔壁によって隔てられている。1つのチャンバーは、サンプル導入の流入口を含み、検出電極を含む。もう1つのチャンバーは、サンプルの水性溶液を吸着できる吸収物質を、通常は乾燥状態で含む（しかし、サンプルが有機相にあり、吸収物質は有機相の溶液を吸着するであろう場合がある）。

【0099】

このように、好ましい実施態様では、サイズ排除隔壁が用いられる。本明細書で「サイズ排除隔壁」は、成分をその分子量に基づいて排除する物質を意味する。従って、例えば、ゲル基質（本明細書において浸透層で概説するようなもの。アクリルアミド、アガロースなど）または当分野で周知のようなサイズ排除遮断膜を使用する。いくつかの実施態様では、特に標的被検体がシステムの他の混入成分に比べて大きい分子量を有する場合、膜またはゲルによる分子量の遮断は、複雑さを減少させる工程を行うためにも選択される。つまり、例えばリボソームRNAが標的被検体である場合に、平均的なmRNAを通過させるサイズ排除隔壁を使用する。同様に、標的被検体が大きいゲノムDNAを含む場合、mRNAと断片化したDNAを通過させる、分子量の遮断物を用いることができる。

【0100】

この実施態様では、サンプル導入に際して、検出チャンバーで標的被検体を濃縮しながら、標的被検体を含有する水性溶液を、検出電極を含む検出チャンバーから吸着チャンバーへ移動させる。従って、例えば、1mlのサンプルを、0.95mlの吸着チャンバーを有するカートリッジに注入すると、標的被検体は検出チャンバー中で20:1に濃縮される。

【0101】

好ましい実施態様では、検出チャンバーおよび吸着チャンバーは電極を含む基板中の孔またはパイアによって隔てられているが、いくつかの実施態様ではサイズ排除隔壁の「上に」検出電極があることも可能である。

【0102】

この実施態様では、吸着を助長するために、カートリッジ中の各チャンバーの容積を調整することが望ましい。つまり、検出チャンバーの容積がサンプルの容積と同じかまたはより少ない場合、チャンバーへサンプルを注入しても、吸収物質が乾燥保存状態にあれば、吸着に至らないかもしれない。しかし、サンプルの容積が検出チャンバーの容積よりもわずかに大きければ、仕切られたチャンバーにサンプルを注入することにより、吸収物質を「湿らせる」ことを押し進めることができ、かくして毛管現象を通じて反応を引き起こす。従って、好ましい実施態様では、液体が吸着チャンバーに「押し込まれる」ように、検出チャンバーの

容積はサンプルの容積よりわずかに小さい。

【0103】

さらに、サイズ排除隔壁の使用によって、サンプル容積に基づくハイブリダイゼーションの促進が可能になる。つまり、膜やゲル基質のようなサイズ排除隔壁の使用によって、水性溶液をサイズ排除隔壁を通じて吸着チャンバーへ押しやりながら、大容積のサンプルを検出チャンバーに導入し得る。従って、例えば、サンプルの容積が5ml、検出チャンバーの容積が1ml、吸着チャンバーが4mlならば、サンプルの容積中の標的被検体の5倍の濃縮が達成される。当業者に了知されるであろうように、このことは吸着チャンバー内に吸収物質があっても無くても行われ得る。この実施態様で重要なことは、サイズ排除隔壁が、標的被検体を検出電極の近傍から離れるのを防ぐということである。さらに、いくつかの実施態様では、サンプルチャンバーの容積は調整可能である；つまり、サンプルの導入に際しては、サンプルチャンバーは全サンプルを保持するために十分大きい。しかし、サンプル溶液が吸着チャンバーに「引きこまれる」につれて、サンプルチャンバーの容積は、例えば膜や曲げやすい封の使用を介して、減少する。このようにして、濃縮された標的被検体を、検出電極の近傍に保持する。

【0104】

当業者に了知されるであろうように、図16に一般的に描写するように、該システムは数々の配置をとることができる。

【0105】

好ましい実施態様では、吸収物質を電気泳動と合同で使用し得る。つまり、図16に一般的に描写するように、本明細書で概説する配置を「混合する」ことを含む、使用され得る数々の配置がある。

【0106】

さらに、図13Bに描写するように、サンプルが、電気泳動チャンネルに沿って置かれた数々の検出電極を通過して流動するのを可能にするように、システムを配置する。つまり、本明細書で概説するように、できるだけ多くのサンプルを検出電極に接触させるために、サンプル受取チャンバーを配置し得る。

【0107】

同様に、2つの電極システムを用いる場合、好適な態様では第1および第2電気泳動電極間に設置した多孔性検出電極を利用するが、それによって標的が検出電極を「通過」するようにし、標的被検体と検出電極の接触を最大化するようにする。例えば、ポリカーボネートの微細孔膜を電子顕微鏡分析用に金スパッター被覆する。あるいは、金被覆ポリアニリンを使用することができる。このように、0.01ないし20 μm の範囲の極めて均一な細孔サイズを有する金電極を作製し得る。同様に、10 μm 細孔のシリコン・ウェハーが標的配列の捕獲を700倍上昇させる遺伝子センサーとして使用するように開発されている。流速、パッド領域、孔径、深さ、および電気泳動パラメーターを調整することにより、サンプル中の標的被検体の実質的に100%を検出電極に結合させ得る。

【0108】

多数の電気泳動工程を用い得ることも留意すべきである；例えば、システムの構成成分は連続的に添加し得るが、検出電極に試薬を送達するために各添加後に電気泳動工程を実施する。同様に、電気泳動は「洗浄」工程を実施するために使用してもよいが、その場合、過剰の試薬（非結合標的分子または非結合の余分の結合リガンド成分など）は検出電極から排除される。このように、電気泳動工程はいずれかを組合わせて使用することができる。さらに、電気泳動工程の時間が変更可能である。

【0109】

さらに、本明細書に概説するように、電気泳動工程は検出電極表面に被検体を濃縮するための他の技法と組み合わせることもできる。例えば、図13に示すように、このシステムはサンプルが検出電極の一方向に流れるように、反対方向の電気泳動の流れと連結して構成することができるが、それによって標的被検体を効率的に濃縮し得る一方、他のサンプル成分（特に未変化の成分または被検体と逆の電荷をもつ成分）を「洗い流す」ことができる。この態様において、電界強度は標的のサイズと電荷に基づいて調節し、標的が検出電極に相対的に固定された状態とする。

【0110】

さらに、当業者に了知されるであろうように、ハイブリダイゼーションを最大

限促進するために、サンプル受取チャンバーを形成することも可能である。例えば、全サンプルが電気泳動の領域に収まるように、チャンバーを配置し得る；このことは、幅広く多様な方法で行われ得る；例えば、異なる幾何的形態（三角形など）を用いる、電極にチャンバーの1つまたはそれ以上の表面を覆わせる、などによる。

【0111】

好適な態様において、標的被検体の濃縮はアッセイ試薬混合物中で少なくとも1つの容積排除剤を用いることにより達成される。この態様において、容積排除剤は溶媒とイオンなどの小分子を吸収するが、標的被検体などの大型分子は排除するものであり、これを包含させることで標的被検体を見掛け上より小さな容積に濃縮し、それによって標的被検体が遭遇する有効な拡散容量を縮小し、それによって標的が捕獲リガンドを見つけ出す可能性を増大させる。当業者が認めるように、容積排除剤は検出電極に接近するサンプルを必ずしも濃縮するものではない；むしろ、標的被検体が遭遇するまたは存在する有効な拡散容量を縮小するものである。

【0112】

このように、本発明方法は少なくとも1種の容積排除剤をアレイ混合物に添加することを含む。当業者が認めるように、この操作は実質的にアッセイのどの段階で実施してもよく、例えば、他の試薬類（例えば、標識プローブなど）を添加する前に排除剤とサンプルを事前に混合すること、1種以上の他のアッセイ試薬と共に、またはアッセイ試薬の添加後に排除剤を添加することなどである。あるいは、サンプルの存在下で膨潤するような容積排除剤（例えば、アガロース、セファデックス、セファロース、ポリアクリルアミドなど）で検出チャンバーを予め被覆してもよい。一部の態様において、標的被検体に対し非貫通性の膜を使用し、検出電極から容積排除剤を分離することもできる。同様に、システムの他の構成部分は、膨潤性の容積排除剤、例えば、本明細書に記載した磁性粒子などで被覆してもよい。一般に、該試薬を他のアッセイ試薬と共に加えることが好ましい。添加後は、当業者が認めるように、一般的にはインキュベーション工程がある。

【0113】

適切な容積排除剤は技術上既知であり、これらに限定されるものではないが、デキストラン、デキストラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ポリエチレングリコール、ポリ硫酸、ヘパリン硫酸、ヘスパン、高分子量核酸などである。例えば、以下の文献を参照：Amasino, Anal. Chem. 152:304 (1986); Wetmur, Biopolymers 14:2517 (1975); Renz et al., Nucl. Acid Res. 12:3435 (1984); Wahl et al., PNAS USA 75:3683 (1979); and Gingeras et al., Nucl. Acid Res. 15:5373 (1987); これらの文献すべてを出典明示により本明細書の一部とする。さらに、これら試薬の混合を実施してもよい。容積排除は濃縮工程であるが、排除剤は以下に述べるようにハイブリダイゼーション促進剤とも考え得ることを留意すべきである。

【0114】

好適な態様において、標的被検体の濃縮は標的被検体を沈殿させることによって実施される。これは特に核酸について有効である。すでに示されているように、核酸の沈殿はハイブリダイゼーション速度を50倍ないし100倍増大する；EP0229442A1（出典明示により本明細書の一部とする）参照。上記のように、沈殿は濃縮工程であるが、沈殿剤は以下に説明するようにハイブリダイゼーション促進剤とも考え得る。好適な態様においては、2本鎖核酸を沈殿させるが、1本鎖核酸は沈殿させない条件を選択し、これが強力な推進力となり、非特異的損失を削減する。

【0115】

適切な核酸沈殿剤は、これらに限定されるものではないが、以下のとおりである：少なくとも1種の強力な塩析カチオンまたはアニオン基を含む塩（ SO_4 、 PO_4 、 Li および COOH のアルカリ金属塩およびアンモニウム塩）；本反応溶液と混和し得る、沈殿性もしくは塩析性を有する有機化合物、例えば、これらに限定されるものではないが、デタージェント（Pontius et al., PNAS USA 88: 8237 (1991)参照；出典明示により本明細書の一部とする）、ジヒドロキシベンゼン、サルコシル（N-ラウロサルコシン・ナトリウム塩）、ドデシル硫酸ナトリウム、ジイソブチルスルホコハク酸ナトリウム、およびテトラデシル硫酸ナト

リウム。各試薬の適切な濃度は出典明示した文献に記載されている。以下に概説するいくつかの応用例では、デタージェントは、実際には核酸を沈殿させるものではなく、むしろハイブリダイゼーション促進剤として添加される。

【0116】

さらに、EP0229442A1に記載されているように、さらなる試薬、例えば、EGTA、EDTA、SDS、SK、PK、EtOH、尿素、グアニジンHCl塩、グリコーゲン、希アンフィルなどを添加してもよいが、これらに限定されるものではない。さらに、既知濃度の少なくとも1種の核酸変性剤、例えば、アルコールを添加してもよい。

【0117】

上記のように、核酸沈殿剤の添加は実質的にアッセイのどの段階で実施してもよく、例えば、他の試薬類（例えば、標識プローブなど）を添加する前に該沈殿剤とサンプルを事前に混合すること、1種以上の他のアッセイ試薬と共に、またはアッセイ試薬の添加後に該沈殿剤を添加することなどである。一般に、該試薬を他のアッセイ試薬と共に加えることが好ましい。添加後は、当業者が認めるように、一般的には再度インキュベーション工程がある。

【0118】

好適な態様において、濃縮は、2つの分離可能な溶液相を形成する少なくとも2種の試薬を包含させることにより実施し、標的被検体が当該相の一方にまたは界面に濃縮されるようにする。技術上知られているように、もしサンプルが2相に分離し得る溶液相に向けられるならば、被検体は一方の相から他方に移動し、結果として一方の相に濃縮されることとなり、あるいは一部の状況下では、2相間の界面で濃縮が起こる。例えば、以下の文献を参照：Albertsson et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 103: 1-12 (1965); Kohne et al., *Biochem.* 16 (24): 5329 (1977); Mueller, *Partitioning of Nucleic Acids*, Ch. 7 in *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems*, Academic Press, 1985; Mueller et al., *Anal. Biochem.* 118: 269 (1981); これらの文献すべてを出典明示により本明細書の一部とする。このように、サンプル容量、各相の容量、検出電極チャンパーおよび検出電極の位置を設定することにより、電極での好適な濃縮を達成し

得る。Mueller, Partitioning of Nucleic Acids, Ch. 7 in Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Academic Press, 1985 およびAlbertsson (前出)に示されているように、分配は、イオン強度とイオン種双方を含む電解質組成、ポリマー濃度、核酸のサイズ、核酸の構造および/または複雑さ、およびある種リガンドの存在または不存在などにより影響される。

【0119】

好適な態様において、リガンドは分配混合物に含ませ、分配を実施することができる。Mueller らの両文献に示されているように、核酸に結合するリガンドを包含させることで分配を果たすことができる。このように、例えば、PEGなどのヘテロアルキル鎖に共有結合した核酸結合色素を用いることにより、分配係数を著しく上昇させることができる。Mueller et al., Anal. Biochem. 118:267 (1981); および Mueller et al., Eur. J. Biochem. 128: 231 (1982)参照 (両文献を出典明示により本明細書の一部とする)。

【0120】

好適な態様において、フェノール・エマルジョン再会合技法(PERT)を上記 Kohne ら記載どおりに実施する。この態様においては、フェノールと水(または他の水性溶液)を適切な比率で添加し、振盪または混合し、エマルジョンを形成する。振盪を止め、エマルジョンを壊し、2相を形成する。1本鎖核酸と塩を水相に添加することで、極めて急速にハイブリッドが形成される。上記 Kohne ら記載どおりに、核酸ハイブリダイゼーション速度は以下に左右される: (a) エマルジョンの存在; (b) イオンの型と濃度; (c) インキュベーションの適切な温度; (d) 適当な pH; (e) エマルジョンの攪拌速度と方式; (f) 存在するフェノール量; (g) 核酸の断片のサイズ; (h) 核酸の複雑さ; および (i) 核酸濃度。

【0121】

さらに、分配化はタンパク質についても既知である; Gineitis et al., Anal. Biochem. 134:400 (1984) (出典明示により本明細書の一部とする) 参照。

【0122】

好適な態様において、容積排除および分配化は同時に実施してもよい。例えば

、デキストラン（3～8%）およびPEG（3.5～6%）を混合し、分離した相を形成する。カチオンまたはアニオンの比をシフトさせ、高分子量核酸を一方の相から他方へ移動させ、二重らせんの形成を誘発する。

【0123】

好適な態様において、濃縮工程はシャトル粒子を用いて実施する。一般に、この技法は以下のように説明し得る。重力により検出電極上に静置するか（例えば、検出電極がチャンバーの「底部」にある場合）、浮遊するか（例えば、検出電極がチャンバーの「上部」にある場合）、または検出電極と会合するように誘発され得る（例えば、磁性粒子の使用による）シャトル粒子が使用される。これらのシャトル粒子はアッセイ溶液中で標的被検体と会合する結合リガンド（一般に必ずしも非特異的とは限らない）を含み、標的被検体を検出電極に往復輸送するが、そこで被検体は遊離され捕獲結合リガンドに結合する（以下に概説するように直接または間接に）。当業者が認めるように、シャトル結合リガンドは、好ましくは、アッセイ複合体の構成分、すなわち、捕獲結合リガンドよりも余り強固ではなく標的被検体と相互に作用する。すなわち、シャトル粒子との相互作用は、検出電極に結合しようとする標的被検体の遊離を可能とするために十分に弱くなければならない。

【0124】

好適な態様において、標的被検体は核酸であり、シャトル粒子は多くの様式で構成され得る。あるシステムにおいて、シャトル粒子は一般に標的被検体に結合し得る短鎖（すなわち、4ないし10であり、使用する温度に左右されるが、より長くてもよい）の核酸プローブを含む。これらは特異的（すなわち、標的被検体に特異的な短鎖配列を含む）であっても、または非特異的（すなわち、サンプル中の核酸すべてを表面に往復輸送するランダム・プローブ）であってもよい。核酸が粒子に付着するのは既知である；例えば、U. S. S. N. 60/105, 875およびChad Mirkinの資料を参照。同様に、非核酸標的については、多様な結合親和性をもつリガンドが使用し得る；例えば、タンパク質に弱く結合する抗体をビーズに付着させ、より親和性の強い抗体を表面上の捕獲リガンドとして作用してもよい。あるいは、溶液変化を用いてビーズから表面への伝達を推

進してもよい。

【0125】

あるいは、核酸およびタンパク質を含む他のタイプの被検体については、粒子を修飾し（例えば、アミン部分（リジン部分など）またはカルボキシ基での誘導化により）、標的と粒子が静電相互作用するための電荷を保持させてもよい。

【0126】

好適な態様において、再度、標的被検体が核酸である場合、シャトル粒子は核酸結合成分を含んでいてもよく、それが1本鎖または2本鎖核酸に結合する。例えば、層間物質を含む粒子は既知である；米国特許第5, 582, 984（その全文を出典明示により本明細書の一部とする）参照。同様に、1本鎖または2本鎖結合タンパク質を含む粒子を作製し得る。検出表面での標的被検体は既知の技法、例えば、加熱、pH変更、塩変更などにより遊離し得る。これらの粒子はすべての標的被検体に結合して、残余のサンプルを洗い流すかまたは除去することを可能にするか、または標的被検体を含む粒子をサンプルから取出すことを可能にするので、サンプル調製に使用し得るということを留意すべきである。

【0127】

好適な態様において、電極表面または本明細書に記載の基板表面は、標的被検体に対する結合を増大させるか、および／または有効拡散空間を縮小するように変更することが可能である。すなわち、三次元（検出チャンバー）から二次元（検出表面）に縮小すると、結合反応速度を有意に上昇させる。この縮小はいくつかの方法で達成し得る。例えば、好適な態様において、SAMの末端基は標的被検体と逆の電荷の静電基をもつように修飾することができる。このように、特定の標的分子が表面と会合する時間が増大し、拡散は三次元よりも二次元において好適に起こる。これが標的被検体を拡散層から検出表面上に有効に移動させ、新たな標的被検体を拡散層に運ぶ勾配を形成する。このように、例えば、カチオン末端不動態化剤、例えば $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{NR}_3^+$ などを用いてもよい。あるいは、検出チャンバーの基板全体（すなわち、個々の電極周辺領域）を、本明細書に記載のシャトル粒子同様、弱く結合するリガンドで被覆し、結合リガンドの「芝生」を形成してもよい。例えば、特異的に標的配列に結合するか、または相対的に短

い非特異配列であるオリゴヌクレオチド・プローブを表面上で用いることができる。標的配列とこれらの表面プローブとの会合に基づき、結合と遊離の平衡を介しての拡散は、三次元の拡散よりもむしろ二次元の拡散を可能にする。この態様において重要なことは、表面リガンドと標的被検体間の相互作用は捕獲リガンドよりも弱く、その結果、捕獲リガンドへの結合が優先することである。これは核酸の場合にはプローブの長さにより制御し得る；捕獲プローブは一般に表面プローブよりも長い。当業者が認めるように、これらの技法は単独で、または本明細書に概説した他の促進技法のいずれかに加えて実施し得る。

【0128】

さらに、以下により詳しく記載するように、粒子を「混合粒子」としても使用することができ、検出電極近傍の溶液を攪拌する働きをし、かくしてハイブリダイゼーションを増加させる。

【0129】

好適な態様において、結合の促進は、所定の時間内に検出電極に結合し得る標的被検体量を最大化するようにシステムを構成することで実施される。この操作は、例えば、標的被検体を含む大容量のサンプルを、標的被検体が検出電極と会合する可能性が高くなるように検出電極に流すか、露呈することにより実施する。

【0130】

従って、好適な態様において、本方法は標的被検体を含むサンプルを検出電極に流し、アッセイ複合体を形成させることを含む。この態様において、標的被検体の濃縮は単位時間当たりに大量のサンプルが検出電極と接触する結果として起こり、停滞するサンプルに比較し結合時間をも短縮させる。このように、好適な態様において、電気泳動について上述したように、検出電極を含む装置は、サンプルが検出電極を通過流出するように構成することができる。このように、好適な態様では、金電極などの多孔性電極を、上記概説のように、サンプル・フロー・チャンネルに位置するように利用する。例えば、WO 95/11755（出典明示により本明細書の一部とする）参照。サンプルは必要であればさらに再循環してもよい。回転式ディスク電極も好ましい。

【0131】

このように、好適な態様においては、検出電極と周囲領域をサンプルが混合されるように構成するが、それがこの拡散層を攪乱するように働き、表面に大きく接近するのを可能にする。例えば、一態様において、検出電極は狭いサンプル・チャンネルに設置する。このように、実質的に、検出電極はチャンネルの周長を囲むバンドまたはゾーンである。再度、上記概説のように、再循環が生じ得る。

【0132】

別の態様において、チャンバーに関して、電極を通過するサンプルの流動が混合またはサンプル乱流を起こすように、検出電極を構成する。例えば、一態様において、検出電極はチャンバーに関して「くぼみ」または「へこみ」であり、電極を通過するサンプルの流動（フロー）を混合するようにする；図13参照。この効果は盛り上がった表面、ある場合には本明細書において「ワイヤ」と呼ぶものを、混合を引起す電極（くぼみ電極を含む）の縁に設けることにより高めることができる。

【0133】

本明細書に開示した方法のいずれかに加えて、またはその代りに、好適な態様では粒子を「混合ボール」として利用する。本明細書にて「粒子」または「マイクロ粒子」または「ナノ粒子」または「ビーズ」または「マイクロ球」とはマイクロの粒状物を意味する。当業者が認めるように、該粒子はその用途により様々な物質を含むことができる；例えば、これらに限定されるものではないが、架橋デンプン、デキストラン、セルロース、タンパク質、ポリスチレンとメチルスチレン並びに他のスチレン共重合体を含むスチレンポリマーを含む有機ポリマー、プラスチック、ガラス、セラミック、アクリル・ポリマー、磁気応答物質、コロイド、トリア・ソル、炭素黒鉛、二酸化チタン、ナイロン、ラテックス、およびテフロンなどがすべて使用し得る。Bangs Laboratories Fishers IN からの“Microsphere Detection Guide”は有益な案内書である。好適な態様では、下記概説のように、磁性粒子を利用する。さらに、ある事例では、混合粒子はマイクロ粒状物を含む必要がない；例えば、重力混合では（すなわち、装置の攪拌に基づく混合のため）サンプルとは異なる密度の成分を使用することができる；気泡も例えば混

合粒子として使用し得る。

【0134】

他の態様において、混合粒子は高い誘電率をもつものを選択し、該粒子が、集光または拡散無線周波 (r f) 場により生成させ得る電磁場勾配を当てることで取出せるようにする。ある場合にはまた、粒子は反磁性物質を含んでいてもよい。かかる粒子は線形磁場を当てても本質的に影響を受けないが、非線形磁場を当てることで取出し得る；非線形磁場は非線形磁石を用いるか、または大型の線形磁石を小型の強磁性または常磁性混在物と組合わせて用いることで加え得る。

【0135】

粒子サイズはその構成物に依存する。粒子は球状である必要がない；不揃いの粒子を使用してもよい。さらに、粒子は多孔性であってもよく、それによって部分の付着のために利用し得る粒子の表面積を拡大し得る。一般に、粒子サイズはその組成成分と共に変わる；例えば、磁性粒子は一般にコロイド粒子よりも大きい。このように、粒子は1～5 nm (コロイド) ないし200 μ m (磁性粒子) の範囲の直径を有する。

【0136】

当業者が認めるように、粒子はアッセイのどの時点でも、すなわち、サンプルの添加前、添加に際し、または添加後に加えることができる。

【0137】

粒子はより多くの標的が結合するようにサンプルを攪拌する助けとなる。これは多くの方法で達成し得る。例えば、粒子を検出チャンバーに加え、チャンバーまたは装置全体を掻き混ぜる。好適な態様においては、技術上既知の磁性マイクロ粒子などを使用し得る。好適な態様においては、第1粒子は磁性粒子または磁性の発揮を誘発し得る粒子である。本明細書での「磁性」とは、該粒子が強磁性、常磁性、および反磁性を含む磁場に吸引されることを意味する。この態様において、粒子は、好ましくは、直径が約0.001ないし約200 μ m、さらに好ましくは約0.05ないし約200 μ m、特に好ましくは約0.1ないし約100 μ m、とりわけ好ましいのは約0.5ないし10 μ mである。

【0138】

この態様において、磁場の方向および／または強度は、例えば、検出チャンバ一周囲に多様な方向にビーズを動かす電磁石を設置することで変化させることが好ましい。このように、例えば、往復輸送と混合用粒子としての磁性シャトル粒子の使用が多様な磁場により遂行し得る；該磁場により、粒子を検出電極に移動し、また、検出電極表面でビーズをかき混ぜる。あるいは、非磁性粒子を加え、上述の流動型混合を強化し得る。

【0139】

マイクロ粒子のサイズは本明細書記載のように変化する。4.5 μm のマイクロ粒子は溶液中拡散の影響を比較的受けずに固相支持体上に留まることが観察されているが、同じサンプルにおいて、1.0 μm の粒子は固相表面から離れて懸濁状態のままにあり、拡散を強めるように思われる。このように、大きな粒子は、流動と組合わせた場合に拡散層内で遊離した状態で移動し得る。

【0140】

さらに、粒子は促進作用と組合せるために、例えば、本明細書記載の容積排除剤またはハイブリダイゼーション促進剤により化学的に変化を加えてもよい。

【0141】

当業者が認めるように、上記のシャトル粒子は混合粒子としての二重機能をもつことも可能である。

【0142】

このように、本発明は検出電極と混合粒子を含む構成物、および当該構成物を用いる標的被検体の検出方法を提供する。

【0143】

さらに、技術上知られているように、表面における標的捕獲の律速段階の一つは、分子が固相近辺の境界層を横切る拡散であると考えられる。この境界層はサンプル流動の間にもよく混合しているようには見えない。この境界層およびその統計的深度は溶媒、固相および液相の性質の関数である。従って、これらのパラメーターの変化は、標的被検体が表面に達するために通過しなければならない境界層を「縮小」するように作用し得る。例えば、液相の有機含量を調節し、被検体がより表面に接近し易いようにする。このことに影響し得る他のパラメーター

は粘性、表面電荷、標的の二次および三次構造、および温度である。

【0144】

好適な態様において、標的被検体が核酸である場合、結合促進はハイブリダイゼーション促進剤を使用することにより実施する。この態様において、検出電極に対する標的被検体の結合はハイブリダイゼーション促進剤の存在下を実施する。本明細書に説明するように、核酸ハイブリダイゼーションの速度を事実上上げる様々なハイブリダイゼーション促進剤が存在し、例えば、核酸結合タンパク質、塩、多価イオン、およびデタージェントなどであるが、これらに限定されるものではない。

【0145】

好適な態様において、ハイブリダイゼーション促進剤は核酸結合タンパク質である。技術上示されているように、ある種の結合タンパク質は1本鎖核酸のハイブリダイゼーション速度を増進する；Pontius et al., PNAS USA 87:8403 (1990) および米国特許第5, 015, 569号（両文献を出典明示により本明細書の一部とする）参照。このように、例えば、hnRNP（A1 hnRNP）およびrecAはすべて2本鎖核酸のアニリング速度を上げることが知られている。他の1本鎖核酸結合タンパク質および主要および少数派定型結合タンパク質も使用し得る。適切な条件は既知であるか、またはその技術から説明される。

【0146】

好適な態様において、ハイブリダイゼーション促進剤は塩である。技術上知られているように、高濃度の塩を含有させ、ハイブリダイゼーション速度を上昇させ得る；EP 0 229 442 A1（出典明示により本明細書の一部とする）参照。一般に、大まかに2Mまでの塩濃度がハイブリダイゼーション速度を上昇させ得る。適切な塩は以下のとおりであるが、これらに限定されるものではない：塩化ナトリウム、塩化セシウム、リン酸ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化カリウム、臭化ナトリウム、硫酸ナトリウム、および塩化アンモニウム。

【0147】

好適な態様において、ハイブリダイゼーション促進剤は多価イオンである。M

g^{++} など原子価の高いイオンは静電的相互作用を介して核酸鎖の親和性を増進し、かくして、ハイブリダイゼーションを促進する。さらに、これらの多価イオンは潜在的に表面上でのパッキングに影響し得る；すなわち、表面上の核酸密度が増大するにつれ、陰性電荷が蓄積し、それが引続くさらなる核酸の結合を阻害する。従って、「塩橋」として働き得る多価イオンを含有させると、ハイブリダイゼーションを増進させるように働き得る。 Mg^{++} は同様の効果をもつ。

【0148】

さらに、 Mg^{++} などのある種のイオンは、RNAでの結合を他の方法によって改善することが示されている。RNAは Mg^{++} イオンの周囲にループを形成し、 Mg^{++} と配位する安定な二次構造になる。 Mg^{++} を取除くと、RNAが他の構造に変化し、その構造もまた安定であり得る。しかし、遷移段階は到来するプローブの接近性を高める期間である。従って、 Mg^{++} を、次いでEDTAまたは同様のキレート化剤を連続して繰返し加え、この遷移段階を経て循環させ、結合を高める。

【0149】

好適な態様において、ハイブリダイゼーション促進剤はデタージェントである；Pontius et al., PNAS USA 88:8237 (1991) (出典明示により本明細書の一部とする) 参照。この事例において、ある種のデタージェントは104倍もハイブリダイゼーション速度を上昇させ得る。適切なデタージェントは、これらに限定されるものではないが、カチオン・デタージェントであり、これらに限定されるものではないが、臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTAB) および臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB), 並びに他の種類の臭化四級アミン・テトラメチルアンモニウム (TMAB) である。

【0150】

上記方法はすべて所定時間内に結合と検出のために検出電極上に接近し得る標的被検体量を増加させることを目的とする。本発明の検出システムは標的被検体結合の結果として電子伝達部分 (ETM) をアッセイ複合体内に取込ませることに基づく。

【0151】

一般に、2つの基本的検出メカニズムがある。好適な態様において、ETMの検出は、2本鎖核酸の積層した π -軌道を通しての電子伝達に基づく。この基本的メカニズムは米国特許第5,591,578号、第5,770,369号、第5,705,348号およびPCT US97/20014に記載されており、本明細書では「メカニズム-1」と名付ける。簡単に説明すると、これまでの研究では、電子伝達が、2本鎖核酸の積層した π -軌道を通しては急速に、また、1本鎖核酸では有意によりゆっくりと進行することが示されている。従って、このメカニズムはアッセイの基本となり得る。このように、伝導性オリゴマーを介して検出電極に付着している核酸にETM（下記のように、鎖の一方に共有結合により、またはハイブリダイゼーション指示薬の使用を経てハイブリダイゼーション複合体に非共有結合により）を加えることにより、ETMと電極間の電子伝達が、核酸と伝導性オリゴマーを通して検出し得る。この一般的な概念を図3に描出する。

【0152】

これは標的被検体が核酸である場合に実施し得る；あるいは、非核酸標的被検体は任意の捕獲結合リガンド（標的被検体を検出電極に付着させるための）および核酸「テール」をもつ可溶性結合リガンドと共に用いられ、これが次いで直接または間接的に検出を実施するための表面上の検出プローブに結合することができる。この一般的な概念を図3Cに描出する。

【0153】

あるいは、必ずしも核酸を経由する電子伝達を介在せずにETMを検出することができ、むしろ伝導性オリゴマーを用いて検出することができる；すなわち、ETMからの電子は積層した π -軌道を通して移動してシグナルを生成する必要がない。代わりに、伝導性オリゴマーを含むSAMの表面にETMの存在することが直接検出し得る。この基本的概念は本明細書において「メカニズム-2」と呼ぶ。従って、標的被検体の結合により、ETMを含む可溶性結合リガンドは表面上に搬送され、ETMの検出が進行する。伝導性オリゴマーを含むSAMの役割は、溶液成分から電極を保護し、電極に対する非特異結合量を低減させることである。別の見方をすれば、結合リガンドの役割は、ETMを表面に採り入れるた

めの特異性を与えることであり、そこでETMは電子的に露出した末端をもつ伝導性オリゴマーにより検出可能となる。この一般的な概念を図4、5および6に示す。

【0154】

このように、両態様において、以下により詳細に説明するように、アッセイ複合体はETMを含んで形成され、それを次いで検出電極により検出する。

【0155】

このシステムはアレイ方式での特定用途が明らかになっている；すなわち、アドレス参照可能な検出電極のマトリックスがある場合である（本明細書では「パッド」、「アドレス」または「マイクロ領域」と一般的にいう）。本明細書において、「アレイ」とは複数の捕獲リガンドがアレイ方式にあることを意味する；アレイのサイズはアレイの構成物および最終用途に左右される。約2つの異なる捕獲リガンドから数千ものリガンドまでを含むアレイを作製し得る。一般に、該アレイは電極のサイズ並びにアレイの最終用途によって、2個から100,000以上にも及んで構成される。好適な範囲は約2個から約10,000個であり、好ましくは約5個から約1000個であり、特に好ましいのは約10個ないし約100個である。一部の態様において、本発明の構成物はアレイ方式でない場合もある；すなわち、一部の態様では単一の捕獲リガンドを含む構成物を同様に作製し得る。さらに、一部のアレイにおいて、異なる構成物または同一の構成物を含む複数の基板を用い得る。このように、例えば、大型のアレイは複数の小型基板から構成されてもよい。

【0156】

検出電極は自己集合単層(SAM)を含む。本明細書での「単層」または「自己集合単層」または「SAM」とは、表面上に自動的に化学吸着した分子の比較的顺序だった集合体を意味し、そこでは分子が互いに好ましい方向関係を有しており(例えば、互いに略平行に方向づけられており)、かつ、表面に対し好ましい方向関係を有している(例えば、表面に対し大まかに垂直に方向づけられている)。分子それぞれは官能基を含み、それが表面に接着し、また、一部が単層中の隣接する分子と相互作用し、比較的顺序だった配列を形成する。「まじりあった」単

層は不均質の単層からなる。すなわち、そこでは少なくとも2つの異なる分子が単層を作り上げている。SAMは伝導性オリゴマーのみであっても、あるいは伝導性オリゴマーと絶縁体の混合物であってもよい。本明細書に概説するように、被検体が電極から少し離れているとき、標的被検体結合の有効性(例えば、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション)は増加し得る。同様に、単層が存在すると、生体分子(標的被検体を含む)の電極への非特定結合は、一般に減少する。このように、単層は電極表面から離れている被検体の維持を容易にする。さらに、単層は他種電気活性種を電極表面から離れているようにするのに役立つ。このように、この層は、溶媒内で、各電極と各ETM間または電極と他種電気活性種との間の電氣的接触を防止するのに役立つ。かかる接触は、直接の「短絡」またはサンプル内に存在する可能性のある荷電種を介した間接の短絡となり得る。したがって、ある態様においては、この単層は、好ましくは電極表面上の均一層にきっちりと詰込まれ、「孔」が存在するのを最少にする。この態様では、単層は電極への溶媒接近をブロックする物理的障壁として作用する。

【0157】

好適な態様において、単層は伝導性オリゴマーを含む。本明細書において「伝導性オリゴマー」は実質的に伝導性のオリゴマーを意味し、好ましくは線状であり、そのある態様では文献上「分子ワイヤ」という。本明細書において「実質的に伝導性」とは該オリゴマーが100Hzで電子を移動し得ることを意味する。一般に、伝導性オリゴマーは、伝導性オリゴマーの単量体単位間のように、実質的に重なり合う π -軌道、すなわち、共役 π -軌道を有するが、伝導性オリゴマーは1つ以上のシグマ(σ)結合をも含んでいる。さらに、伝導性オリゴマーは会合したETMへの電子の注入またはETMからの受け入れ能力によって機能的に定義することもできる。さらに、伝導性オリゴマーは本明細書に定義した絶縁体よりもより伝導性である。さらに、本発明の伝導性オリゴマーは電気活性ポリマーとは区別すべきもので、これはそれ自体で電子を供与または受容できるものである。

【0158】

好適な態様において、伝導性オリゴマーは約 10^{-6} ないし $10^4\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ の

伝導性 S を有し、好ましくは約 10^{-5} ないし $10^3 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ であって、これらの S 値は約 20 \AA ないし約 200 \AA の範囲の分子から計算される。以下に記載するように、絶縁体は約 $10^{-7} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ 以下の伝導性 S 、好ましくは $10^{-8} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ より低い値を有する。一般的には、Gardner et al., Sensors and Actuators A51 (1995) 57-66 (参照により本明細書に取込む)を参照されたい。

【0159】

伝導性オリゴマーの所望の性質は、高い伝導性、本発明の構成物の合成と使用のために有機溶媒および／または水への十分な溶解性、および反応に対する好適な化学的抵抗などであるが、該反応が起こるのは、1) 結合リガンド合成の際（すなわち核酸合成であり、本発明の構成物合成に際し、伝導性オリゴマーを含むヌクレオシドを核酸シンセサイザーに加えることができる）、2) 伝導性オリゴマーが電極に付着する際、または3) 結合アッセイの際、である。さらに、自己集合単層の形成を促進する伝導性オリゴマーが好ましい。

【0160】

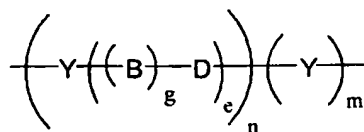
本発明のオリゴマーは、本明細書に記載のように、少なくとも2つの単量体サブユニットを含む。下記に詳しく説明するが、オリゴマーには、ホモおよびヘテロオリゴマーがあり、ポリマーも含む。

【0161】

好ましい実施態様では、伝導性オリゴマーは、構造1に示した構造を持つ：

構造1

【化1】



当業者には理解されたとおり、ここに示した構造は全て、更なる原子または構造を有し得る。即ち、構造1の伝導性オリゴマーは、電極、遷移金属錯体、有機ETM、およびメタロセンなどのETMに、および核酸などの結合リガンドに、またはこれら数種に結合させることができる。特記しない限り、ここに示した伝導性オリゴマーは、その左側で電極に結合させる。つまり、構造1の場合は、左

側の「Y」を本明細書に記載の電極につなげる。伝導性オリゴマーを結合リガンドに結合させるとき、右側の「Y」は、存在するならば、直接的にまたは本発明に記載のリンカーを用いて、核酸などの結合リガンドに結合させる。

【0162】

本実施態様では、Yは芳香族基であり、nは1から50の整数であり、gは1または0のいずれかであり、eは0から10の整数であり、mは0または1である。gが1のとき、B-Dは隣接した結合と共有し得る結合であり(本明細書中でA共役結合@とよぶ)、好ましくは、アセチレン、アルケン、置換アルケン、アミド、アゾ、 $-C=N-(-N=C-, -CR=N-および-N=CR-を含む)$ 、 $-Si=Si-および-Si=C-(-C=Si-, -Si=CR-および-CR=Si-を含む)$ から選択される。gが0のとき、eは好ましくは1であり、Dは好ましくはカルボニルまたはヘテロ原子部であり、このヘテロ原子は、酸素、硫黄、窒素、ケイ素またはリンから選択される。そのため、適切なヘテロ原子部には、 $-NH$ および $-NR$ 、式中、Rは本明細書に定義のとおりである；置換硫黄；スルホニル($-SO_2-$)スルホキシド($-SO-$)；酸化ホスフィン($-PO-$ および $-RPO-$)；およびチオホスフィン($-PS-$ および $-RPS-$)があるが、これらに限定されない。しかしながら、下記に概略説明するとおり、伝導性オリゴマーを金電極に結合させるような場合、硫黄誘導体は好ましくない。

【0163】

「芳香族基」またはその文法的均等物とは、本書では、一般に5から14の炭素原子を含む芳香族単環式または多環式炭化水素部(より大きい多環式環構造を作ることもできるが)およびそれらの炭素環式ケトンまたはチオケトン誘導体で、その遊離の原子価を持つ炭素原子が芳香族環の一員であるものを意味する。芳香族環には、アリーレン基および2つ以上の原子を除いた芳香族基がある。本願の目的には、芳香族は複素環を含む。「複素環」または「ヘテロアリール」とは、1から5個の指定炭素原子を、窒素、酸素、硫黄、リン、ホウ素およびケイ素から選択されるヘテロ原子で置換した、そしてその遊離の原子価を持つ原子が芳香族環の一員である芳香族基、およびそれらの複素環式ケトンおよびチオケトン誘導体を意味する。従って、複素環には、チエニル、フリル、ピロリル、ピリミ

ジニル、オキサリル、インドリル、プリニル、キノリル、イソキノリル、チアゾリル、イミドジル等がある。

【0164】

重要なのは、伝導性オリゴマーのY芳香族基が異なってもよいこと、即ち、伝導性オリゴマーがヘテロオリゴマーであり得ることである。つまり、伝導性オリゴマーは、単一型のY基または複数型のY基のオリゴマーを含むことができる。

【0165】

芳香族基は、本書中で一般にRで表す置換基で置換できる。R基は、必要に応じて加え、伝導性オリゴマーのパッキングに影響を及ぼすことができる、即ち、R基を用いて単層におけるオリゴマーの会合を変化させることができる。R基を加えて、1)オリゴマーまたはオリゴマーを含む組成物の溶解度を変える；2)システムの共役または電子化学電位を変える；および3)単層表面の電荷または特性を変えることもできる。

【0166】

好ましい実施態様では、伝導性オリゴマーが3つのサブユニットより大きいとき、R基は、溶液合成を行う場合の溶解度を高めるのに好ましい。しかしながら、R基およびその位置は、下記のように、表面上、特に単層内での伝導性オリゴマーのパッキングへの影響を最小限にするよう選択される。一般に、単層内では小さいR基のみが使用され、大きいR基は一般に単層表面上にある。そのため、例えば、単層内の伝導性オリゴマー部分にメチル基を付けて溶解度を高めるのが好ましく、例えば、C3からC10のより長いアルコキシ基を単層表面上に付けるのが好ましい。一般に、本明細書に記載のシステムでは、このことは、一般に、立体的に重大なR基は、単層を形成する分子の平均長さによるが、最初の2つまたは3つのオリゴマーサブユニットのいずれにも結合させないことを意味する。

【0167】

適切なR基には、水素、アルキル、アルコール、芳香族、アミノ、アミド、ニトロ、エーテル、エステル、アルデヒド、スルホニル、ケイ素部、ハロゲン、硫

黄含有部、リン含有部、およびエチレングリコールがあるが、これらに限定されない。本明細書に示した構造では、Rは、その位置が置換されていない場合は素である。ある位置では、2つの置換基、RおよびR'が可能であり、その場合、RおよびR'基は同一であるかまたは異なっているかのいずれかでよい。

【0168】

「アルキル基」またはその均等物とは、直鎖状または分枝状アルキル基を意味し、直鎖アルキル基が好ましい。分枝状ならば、1箇所以上の、特記しなければ任意の位置で枝分かれている。このアルキル基は、約1から約30の炭素原子(C1-C30)の範囲であり得、好ましい実施態様では、約1から約20の炭素原子(C1-C20)を利用し、約C1から約C12ないしC15が好ましく、C1ないしC5が特に好ましいが、ある実施態様では、アルキル基は、もっと大きくてもよい。アルキル基の定義の中に含まれるものには、C5およびC6環などのシクロアルキル基や、窒素、酸素、硫黄、またはリンを持つ複素環式環もある。アルキルはまた、好ましくは硫黄、酸素、窒素およびケイ素のヘテロ原子を持つヘテロアルキルも含む。アルキルは、置換アルキル基も含む。「置換アルキル基」とは、更に上記定義の1以上の置換基「R」を含むアルキル基を意味する。

【0169】

「アミノ基」またはその均等物とは、 $-NH_2$ 、 $-NHR$ および $-NR_2$ 基を意味し、Rは本明細書に定義のとおりである。

【0170】

「ニトロ基」とは、 $-NO_2$ 基を意味する。

【0171】

「硫黄含有部」とは、硫黄原子を含有する化合物を意味し、チア-、チオ-およびスルホ-化合物、チオール($-SH$ および $-SR$)、スルフィド($-RSR-$)、スルホキシド($-R-SO-R-$)、スルフォン($-R-SO_2-R-$)、ジスルフィド($-R-S-S-R-$)およびスルフォニルエステル($-R-SO_2-O-R-$)、があるが、これらに限定されない。「リン含有部」は、リンを含有する化合物を意味し、ホスフィンおよびリン酸があるが、これらに限定されない。「シ

リコン含有部」とは、シリコン含有化合物を意味する。

【0172】

「エーテル」とは、 $-O-R-$ 基を意味する。好ましいエーテルはアルコキシ基であり、 $-O-(CH_2)_2CH_3$ および $-O-(CH_2)_4CH_3$ が好ましい。

【0173】

「エステル」とは、 $-COOR$ 基を意味する。

【0174】

「ハロゲン」とは、臭素、ヨウ素、塩素またはフッ素を意味する。好ましい置換アルキルは、部分的にまたは全体的にハロゲン化したアルキル、例えば CF_3 等である。

【0175】

「アルデヒド」とは、 $-RCHO$ 基を意味する。

【0176】

「アルコール」とは、 $-OH$ 基およびアルキルアルコール $-ROH$ を意味する。

【0177】

「アミド」とは、 $-RCONH-$ または $RCONR-$ 基を意味する。

【0178】

「エチレングリコール」または「(ポリ)エチレングリコール」とは、 $-(O-CH_2-CH_2)_n-$ 基を意味するが、エチレン基の各炭素原子は、一重にまたは二重に置換されていてもよく、即ち、 $-(O-CR_2-CR_2)_n-$ 、但し R は上記定義のとおりである、であってよい。酸素の位置に他のヘテロ原子を持つエチレングリコール誘導体(即ち、 $-(N-CH_2-CH_2)_n-$ または $-(S-CH_2-CH_2)_n-$ または置換基を持つ)も好ましい。

【0179】

好ましい置換基には、メチル、エチル、プロピル、 $-O-(CH_2)_2CH_3$ および $-O-(CH_2)_4CH_3$ などのアルコキシ基およびエチレングリコールおよびそれらの誘導体があるが、これらに限定されない。

【0180】

好ましい芳香族基には、フェニル、ナフチル、ナフタレン、アントラセン、フェナントロリン、ピロール、ピリジン、チオフェン、ポルフィリンおよび縮合環誘導体を含むこれらそれぞれの誘導体があるが、これらに限定されない。

【0181】

本明細書に示した伝導性オリゴマーでは、 g が1のとき、 $B-D$ は2つの原子または化学部分をつなげる結合である。好ましい実施態様では、 $B-D$ は、重複または共役 π 軌道を含む共役結合である。

【0182】

好ましい $B-D$ 結合は、アセチレン($-C\equiv C-$ 、アルキンまたはエチンとも呼ばれる)、アルケン($-CH=CH-$ 、エチレンとも呼ばれる)、置換アルケン($-CR=CR-$ 、 $-CH=CR-$ および $-CR=CH-$)、アミド($-NH-CO-$ および $-NR-CO-$ または $-CO-NH-$ および $-CO-NR-$)、アゾ($-N=N-$)、エステルおよびチオエステル($-CO-O-$ 、 $-O-CO-$ 、 $CS-O-$ および $-O-CS-$)および他の共役結合($-CH=N-$ 、 $-CR=N-$ 、 $-N=CH-$ および $-N=CR-$)、($-SiH=SiH-$ 、 $-SiR=SiH-$ 、 $-SiH=SiR-$ 、および $-SiR=SiR-$)、($-SiH=CH-$ 、 $-SiR=CH-$ 、 $-SiH=CR-$ 、 $-SiR=CR-$ 、 $-CH=SiH-$ 、 $-CR=SiH-$ 、 $-CH=SiR-$ および $-CR=SiR-$)などから選択される。特に好ましい $B-D$ 結合は、アセチレン、アルケン、アミドおよびこれら3種の置換誘導体およびアゾである。とりわけ好ましい $B-D$ 結合は、アセチレン、アルケンおよびアミドである。二重結合に結合させたオリゴマー成分は、トランスまたはシス配置、または混合型であってよい。そのため、 B または D のいずれかは、炭素、窒素またはケイ素を含むことができる。置換基は、上記 R のところで定義したとおりである。

【0183】

構造1伝導性オリゴマーの $g=0$ のとき、 e は好ましくは1であり、 D 部分は上記定義のカルボニルまたはヘテロ原子部分であり得る。

【0184】

上記Y環のように、どの単一伝導性オリゴマー内でも、 $B-D$ 結合(または $g=$

0 のとき D 部分) は、全て同じでもよく、または少なくとも 1 つが異なっているもよい。例えば、 m が 0 のとき、末端 B-D 結合は、アミド結合であることができる。残りの B-D 結合はアセチレン結合であることができる。一般に、アミド結合が存在するとき、アミド結合はできるだけ少ない方が好ましいが、ある実施態様では、全ての B-D 結合がアミド結合である。よって、上記 Y 環のところで概略説明したとおり、単層内ではある一つの型の B-D 結合が伝導性オリゴマー中に下記のように存在でき、そして、単層レベル上に別の型の B-D 結合、例えば核酸が伝導性オリゴマーを介して結合している場合核酸ハイブリダイゼーションにより大きな柔軟性を与えるために存在できる。

【0185】

本明細書に示した構造中、 n は 1 から 50 の整数であるが、より長いオリゴマーもまた使用できる (例えば、Schumm et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994 33(13): 1360 参照)。理論によって限定されないが、表面上での効率のよい核酸ハイブリダイゼーションのためには、ハイブリダイゼーションが表面から少し離れて起こるべきであり、ハイブリダイゼーション速度は、特に 200 から 300 塩基対の長いオリゴヌクレオチドの場合、表面からの距離の関数として上昇すると思われる。従って、核酸が伝導性オリゴマーを介して結合しているとき、以下でより詳しく記すように、伝導性オリゴマーの長さは、その核酸の最も近いヌクレオチドが電極表面から約 6 Å から約 100 Å (但し、500 Å までの距離が使用できる) に位置するような長さであり、約 15 Å から約 60 Å が好ましく、約 25 Å から約 60 Å も好ましい。従って、 n は芳香族基のサイズに応じて変わるが、一般に、約 1 から約 20 であって、約 2 から約 15 が好ましく、約 3 から約 10 が特に好ましい。

【0186】

本明細書に示した構造中、 m は 0 または 1 のいずれかである。つまり、 m が 0 のとき、伝導性オリゴマーの末端には、B-D 結合または D 部分があり、即ち、D 原子が直接的かまたはリンカーを介するかのいずれかで核酸に結合している。ある実施態様では、例えば、伝導性オリゴマーを核酸のリボース-リン酸主鎖のリン酸に結合させるとき、伝導性オリゴマーと核酸の間に結合させたリンカーな

どの別の原子があってもよい。更に、下記に概略説明するとおり、D原子は、アミノ修飾リボースの窒素原子であり得る。あるいは、mが1のとき、伝導性オリゴマーの末端にはY、芳香族基があり、即ち、その芳香族基は、核酸またはリンカーに結合している。

【0187】

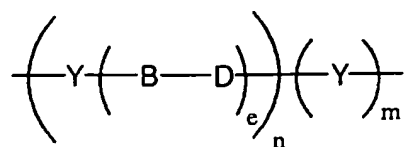
当業者には明らかなように、多数の伝導性オリゴマーが利用できる。これらは、例えば、縮合芳香族環または、 $-(CF_2)_n-$ 、 $-(CHF)_n-$ および $-(CFR)_n-$ などのテフロン(登録商標)様オリゴマーを含む化合物などの当分野で知られている他の伝導性オリゴマーと同じく、構造1や構造8式の範囲内にある伝導性オリゴマーを含む。例えば、Schumm et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 1361 (1994); Grosshenny et al., Platinum Metals Rev. 40 (1): 26-35 (1996); Tour, Chem. Rev. 96: 537-553 (1996); Hsung et al., Organometallics 14: 4808-4815 (1995); およびここに引用されている文献参照、これらは全て出典明示により本明細書に組込まれている。

【0188】

本実施態様の特に好ましい伝導性オリゴマーは、下記である：

構造2

【化2】



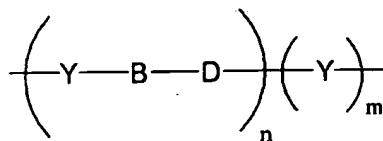
構造2は、gが1のときの構造1である。構造2の好ましい実施態様には、eが0であり、Yがピロールまたは置換ピロールであるもの；eが0であり、Yがチオフェンまたは置換チオフェンであるもの；eが0であり、Yがフランまたは置換フランであるもの；eが0であり、Yがフェニルまたは置換フェニルであるもの；eが0であり、Yがピリジンまたは置換ピリジンであるもの；eが1であり、B-Dがアセチレンであり、Yがフェニルまたは置換フェニルであるもの(例えば、下記構造4参照)がある。構造2の好ましい実施態様はまた、下記構造

3に示した、eが1である場合のものである：

【0189】

構造3

【化3】



構造3の好ましい実施態様は、Yがフェニルまたは置換フェニルであり、B-Dがアゾであるもの；Yがフェニルまたは置換フェニルであり、B-Dがアセチレンであるもの；Yがフェニルまたは置換フェニルであり、B-Dがアルケンであるもの；Yがピリジンまたは置換ピリジンであり、B-Dがアセチレンであるもの；Yがチオフエンまたは置換チオフエンであり、B-Dがアセチレンであるもの；Yがフランまたは置換フランであり、B-Dがアセチレンであるもの；Yがチオフエンまたはフラン(または置換チオフエンまたはフラン)であり、B-Dがアルケンおよびアセチレン交互の結合であるものである。

【0190】

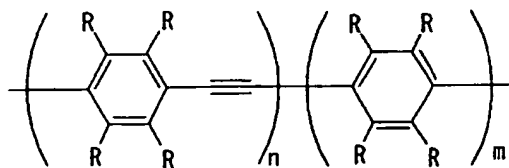
本明細書に示した構造の殆どが構造3の伝導性オリゴマーを利用している。しかしながら、どの構造3オリゴマーも、本明細書中の他の構造、即ち構造1または8オリゴマー、または他の伝導性オリゴマーで置換でき、かかる構造3の使用は、本発明の範囲を限定する意味を持たない。

【0191】

構造3の特に好ましい実施態様は、下記の構造4、5、6および7を含む：

構造4

【化4】

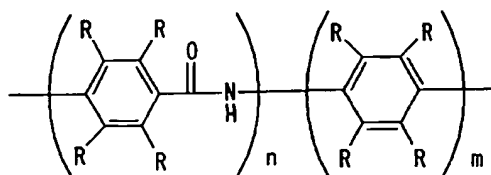


構造4の特に好ましい実施態様には、 n が2であり、 m が1であり、 R が水素であるもの； n が3であり、 m が0であり、 R が水素であるもの、および溶解度を高めるための R 基の使用がある。

【0192】

構造5

【化5】

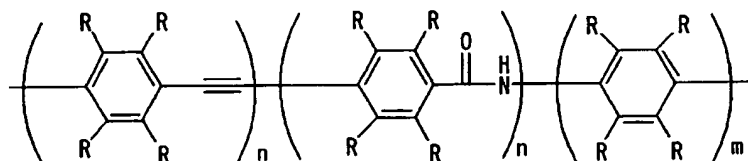


構造5のようにB-D結合がアミド結合であるとき、伝導性オリゴマーは、擬似ペプチドオリゴマーである。構造5中のアミド結合は、カルボニルを左側にし、即ち、CONH-で示すが、逆、即ち-NHCO-も使用できる。構造17の特に好ましい実施態様には、 n が2であり、 m が1であり、 R が水素であるもの； n が3であり、 m が0であり、 R が水素であるもの(この実施態様では、末端窒素(D原子)はアミノ修飾リボースの窒素であり得る)、および溶解度を高めるための R 基の使用がある。

【0193】

構造6

【化6】

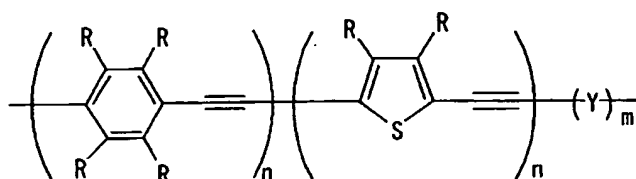


構造6の好ましい実施態様には、第1の n が2であり、第2の n が1であり、 m が0であり、全ての R 基が水素であるもの、または溶解度を高めるための R 基の使用がある。

【0194】

構造7

【化7】



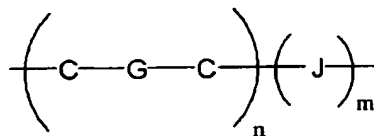
構造7の好ましい実施態様には、第1のnが3であり、第2のnが1-3であり、mが0または1のいずれかであるもの、および溶解度を高めるためのR基の使用がある。

【0195】

好ましい実施態様では、伝導性オリゴマーは、構造8で示した構造を持つ：

構造8

【化8】



この実施態様では、Cは炭素原子であり、nは1から50の整数であり、mは0または1であり、Jは酸素、窒素、ケイ素、リン、硫黄、カルボニルまたはスルホキッドからなる群から選択されるヘテロ原子であり、Gはアルカン、アルケンまたはアセチレンから選択される結合であって、2つの炭素原子と一緒にあってC-G-C基がアルケン(-CH=CH-)、置換アルケン(-CR=CR-)またはそれらの混合物(-CH=CRまたは-CR=CH-)、アセチレン(-C≡C-)またはアルカン(-CR₂-CR₂-, Rは水素または本明細書に記載の置換基のいずれかである)であるようにする。各サブユニットのG結合は、他のサブユニットのG結合と同一かまたは異なってもよく、つまり、アルケンとアセチレン結合が交互にあるオリゴマーが使用できる。しかしながら、Gがアルカン結合であるとき、オリゴマー中のアルカン結合数は最小に維持すべきであり、伝導性オリゴマー当りシグマ結合約6以下が好ましい。アルケン結合が好ましく、本明細書に総括的に示しているが、アルカンおよびアセチレン結合は、当業者に

は明らかなように、本明細書に記載したどの構造または実施態様でも置換できる

。

【0196】

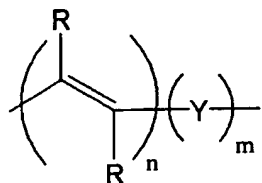
ある実施態様では、例えば、ETMが存在しないとき、 $m=0$ ならば少なくとも1つのG結合はアルカン結合である。

【0197】

好ましい実施態様では、構造8の m は0である。特に好ましい実施態様では、構造9に示したように、 m は0であり、Gはアルケン結合である：

構造9

【化9】



構造9のアルケンオリゴマーおよび本明細書に示した別のものは、一般に、好ましいトランス配置で示しているが、シスまたはトランスとシスの混合したオリゴマーも使用できる。上記のように、R基を加えて、電極上での組成物のパッキング、オリゴマーの親水性または疎水性、およびオリゴマーの柔軟性、即ち、回転、ねじれ、または縦の柔軟性を変えることができる。 n は上記定義のとおりである。

【0198】

好ましい実施態様では、Rは水素であるが、Rはアルキル基およびポリエチレングリコールまたは誘導体であってもよい。

【0199】

別の実施態様では、伝導性オリゴマーは、異なる型のオリゴマー、例えば、構造1や8の混合物であってもよい。

【0200】

伝導性オリゴマーは末端基を有していても有していなくてもよい。従って、好ましい実施態様では、余分な末端基がなく、伝導性オリゴマーはその末端が、例

えばアセチレン結合などのB-D結合のような基の1つで終る構造1から9を示す。あるいは、好ましい実施態様では、本明細書中でしばしば「Q」として示す末端基を加える。末端基はいくつかの理由、例えば、ETMの検出用の伝導性オリゴマーの電子的利用可能性を改善するために、またはSAMの表面を例えば非特異的結合を防ぐなどの他の事由によって変えるために、使用することができる。例えば、標的被検体が核酸である場合、ハイブリダイゼーションを促進するために、末端で陰性に荷電した基として陰性荷電表面を形成させ、核酸がDNAまたはRNAである場合、核酸が表面上に着地するのに反発するか、妨げるようにし得る。好ましい末端基は、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-CH_3$ 等のアルキル基、および、(ポリ)エチレングリコールのような(ポリ)アルキルオキサイドを含み、 $-OCH_2CH_2OH$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_2H$ 、 $-(OCH_2CH_2O)_3H$ 、および $-(OCH_2CH_2O)_4H$ が好ましい。

【0201】

一実施態様において、異なるタイプの末端基を有する伝導性オリゴマーの混合物を使用することが可能である。従って、例えば、いくつかの末端基は検出を容易にし、いくつかは非特異的結合を防止し得る。

【0202】

単層は異なる伝導性オリゴマー種を含み得るが、適度に同一なSAMが形成され得るように、異なる種を選択するのが好ましいことが、理解されるであろう。従って、例えば、核酸などの捕獲結合リガンドを伝導性オリゴマーを用いて電極に共有結合させるとき、1つのタイプの伝導性オリゴマーを使用して核酸を結合させ、別のタイプをSAM中で用いることは可能である。同様に、異なる長さの伝導性オリゴマーの混合物を単層中に有して、非特異的シグナルの減少を促進するのが望ましい。従って、例えば、好ましい実施態様は、単層の残部の表面下、つまり使用されているなら、絶縁層の下で、または他の伝導性オリゴマーの特定のフラクション下で終わる伝導性オリゴマーを利用する。同様に、異なる伝導性オリゴマーを使用して、単層の形成を容易にしたり、別の特性を持つ単層をつくることもできる。

【0203】

好ましい実施態様において、単層はさらに絶縁部を含み得る。本明細書における「絶縁体」とは、実質的に非伝導性オリゴマーを意味し、好ましくは線状である。本明細書において、「実質的に非伝導性」とは、絶縁体が100Hzで電子を伝達しないことを意味する。絶縁体を介した電子伝達の比率は、好ましくは本明細書に記載の伝導性オリゴマーを介した比率よりも遅い。

【0204】

好ましい実施態様において、絶縁体は、約 $10^{-7}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ 以下の伝導率Sを有し、約 $10^{-8}\Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ より低いのが好ましい。一般にGardner et al. (前出)を参照。

【0205】

通常、絶縁体はシグマ結合を有する、アルキルまたはヘテロアルキルオリゴマーまたは部分であるが、いずれの具体的な絶縁体分子も芳香族基または1以上の共役結合を含み得る。本明細書において「ヘテロアルキル」とは、少なくとも1つのヘテロ原子、つまり鎖に含まれた窒素、酸素、硫黄、リン、シリコンまたはホウ素を有するアルキル基を意味する。あるいは、絶縁体は、好ましくは電子伝達を実質的に阻害するかまたは遅らせる1以上のヘテロ原子または結合を添加した伝導性オリゴマーと非常に類似であり得る。

【0206】

適切な絶縁体は当業者に既知であり、 $-(\text{CH}_2)_n-$ 、 $-(\text{CRH})_n-$ および $-(\text{CR}_2)_n-$ 、エチレングリコールまたは酸素の代わりに他のヘテロ原子、つまり窒素または硫黄(電極が金るとき、硫黄誘導体は好ましくない)を用いる誘導体を含むが、これらに限定しない。

【0207】

伝導性オリゴマーについて、絶縁体は本明細書に定義のR基で置換され得、電極でのその部分または伝導性オリゴマーのパッキング、絶縁体の親水性または疎水性、および絶縁体の柔軟性、すなわち回転の、振れのまたは縦の柔軟性を変える。例えば、分枝アルキル基を使用し得る。同様に、上記概説のように絶縁体は特に単層の表面に作用する末端基を含み得る。

【0208】

単層をつくる種の長さは必要に応じて変化する。上記に概説のように、標的被検体の結合(例えば核酸のハイブリダイゼーション)は、表面から離れてより有効であるように見える。核酸が結合する種(下記に概説のように、これらは絶縁体または伝導性オリゴマーのいずれかであり得る)は、基本的に単層を形成する種と同じ長さかそれらより長く、捕獲結合リガンドがハイブリダイゼーションのための溶媒により接近可能となる。いくつかの実施態様において、捕獲結合リガンドが結合する伝導性オリゴマーは単層より短い。

【0209】

当業者には明らかなように、単層をつくる異なる種の、実際の組合せと比率は、非常に広範に変化し得、そしてメカニズム-1またはメカニズム-2のいずれが使用されているか、また、電気泳動の場合、1電極システムまたは2電極システムのいずれかが使用されているかに左右される。これらを以下で詳記する。一般に、メカニズム-2システムでは3成分システムが好ましく、第1の種は、種を含有する捕獲結合リガンド(標的被検体が核酸である場合、捕獲プローブという)を含み、絶縁体または伝導性オリゴマーのいずれかを介して電極に結合している。第2の種は伝導性オリゴマーであり、第3の種は絶縁体である。この実施態様において、第1の種は約90%から約1%を含み得、約20%から約40%が好ましい。標的被検体が核酸である場合、約30%から約40%が短いオリゴヌクレオチド標的に特に好ましく、約10%から約20%が長い標的に好ましい。第2の種は約1%から約90%を含み得、約20%から約90%が好ましく、約40%から約60%が特に好ましい。第3の種は約1%から約90%を含み得、約20%から約40%が好ましく、約15%から約30%が特に好ましい。これらの近似比率を達成するための、SAM構成溶媒中の第1:第2:第3の種の好ましい比率は、短い標的については2:2:1、長い標的については1:3:1であり、全チオール濃度(これらの種との結合に使用する場合、以下で詳記)は、500 μ Mから1mMの範囲および833 μ Mが好ましい。

【0210】

あるいは、2成分システムを使用することができる。ある実施態様では、メカニズム-1またはメカニズム-2のシステムのいずれかで使用する2成分は、第

1 および第2の種である。この実施態様において、第1の種は約1%から約90%を含み得、約10%から約40%が好ましく、約10%から約40%が特に好ましい。第2の種は約1%から約90%を含み得、約10%から約60%が好ましく、約20%から約40%が特に好ましい。あるいは、メカニズム-1システムでは、2成分は第1および第3の種である。この実施態様において、第1の種は約1%から約90%を含み得、約10%から約40%が好ましく、約10%から約40%が特に好ましい。第2の種は約1%から約90%を含み得、約10%から約60%が好ましく、約20%から約40%が特に好ましい。

【0211】

好ましい実施態様として、水性溶液中でSAMの析出を行なう。Steel et al., Anal. Chem. 70: 4670 (1998), Herne et al., J. Am. Chem. Soc. 119:8916 (1997)およびA. J. Bard, Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances, Vol. 20, Dekker N.Y. 1996-のFinklea, Electrochemistry of Organized monolayers of Thiols and Related molecules on Electrodesに概略説明されているように、SAM形成種の析出を水性溶液(しばしば塩を含む)から行なうことができる(これらすべては出典明示により本明細書に組込む)。

【0212】

さらに、電気泳動システムを使用する場合、単層の組成および安全性は、1電極または2電極システムのいずれを使用するかによって決まるであろう。従って、例えば、1電極システムを電気泳動と検出の両方に使用する場合、システムの構成は、電気活性電荷担体を(もしそれを使用する場合)電極に近づけて配置することを可能とする。当業者に明らかであろうように、伝導性オリゴマーの化学結合が、水の加水分解で使用される程度の高電圧で安定あれば、電気活性電荷担体を使用する必要はない。これを数種の方法のうちの1つで行ない得る。好ましい実施態様として、単層は、電子的に露出した伝導性オリゴマーの有効な成分を含む;このような有意な単層は電極の表面を引き上げて、電気活性電荷担体を間接的に電極に接近させる。あるいは、溶媒が直接電極へ接近するように、不十分な単層(すなわち「ピンホール」または「欠陥」を含む単層))を使用することもできる。あるいは、電極の配置を電極がその全表面より少なくSAMで覆われて

いるようにして、電極に直接近接し得るようにしてもよいが、非特異的結合についてはそのような表面は最小にする。

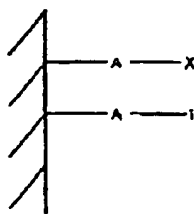
【0213】

伝導性オリゴマーと絶縁体の電極への共有結合は、様々な方法で達成され、使用する電極、および絶縁体と伝導性オリゴマーの組成に依存する。好ましい実施態様として、本明細書に記載のヌクレオシドまたは核酸と共有結合した結合リンカーは、電極に共有結合している。従って、結合リンカーの一方の端または末端がヌクレオシドまたは核酸に結合しており、もう一方が電極に結合している。ある実施態様において、結合リンカーが末端以外の位置で結合するか、またはさらに、分枝結合リンカーが一方の末端で電極に結合し、他の末端で2またはそれ以上のヌクレオシドに結合するのが望ましいことであるが、これは好ましくない。同様に、一般に構造11-13に記載されるように、結合リンカーは2つの部位で電極に結合し得る。一般に構造10で「A」として下記に示すように、あるタイプのリンカーが使用される。構造10において、「X」は伝導性オリゴマー、「I」は絶縁体であり、斜線の表面は電極である：

【0214】

【化10】

構造10



本実施態様において、Aはリンカーまたは原子である。「A」の選択は、電極の特徴に一部依存する。従って、例えば、Aは、金電極を使用する場合、硫黄部である。あるいは、酸化金属電極を使用するとき、Aはオキシライドの酸素に結合したシリコン(シラン)部である(例えば、Chen et al., Langmuir 10: 3332-3337 (1994); Lenhard et al., J. Electroanal. Chem. 78: 195-201 (1977)参照、両方とも出典明示により本明細書の一部とする)。炭素ベースの電極を使用する

とき、Aはアミノ部である(好ましくは、1級アミン；例えば、Deinhammer et al., Langmuir 10: 1306-1313 (1994)参照)。従って、好ましいA部は、シラン部、硫黄部(アルキル硫黄部を含む)およびアミノ部を含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、当分野で既知のようなレドックスポリマーとのエポキシドタイプ結合は使用しない。

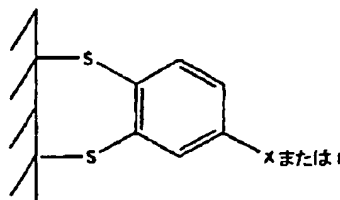
【0215】

本明細書には一つの部分としてしか記載していないが、絶縁体および伝導性オリゴマーは、1個以上の「A」部で電極と結合し得る；「A」部は同一かまたは異なっているもよい。従って、例えば、電極が金電極であり、「A」が硫黄原子または部分であるとき、一般に下記構造11、12および13に記載のように、複数の硫黄原子を、電極に伝導性オリゴマーを結合させるのに使用し得る。当業者に認められるように、このような他の構造が製造できる。構造11、12および13において、A部は硫黄原子だけであるが、置換硫黄部も使用し得る。

【0216】

【化11】

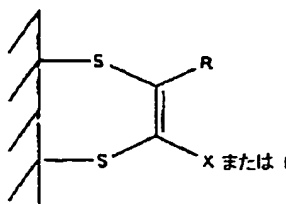
構造11



【0217】

【化12】

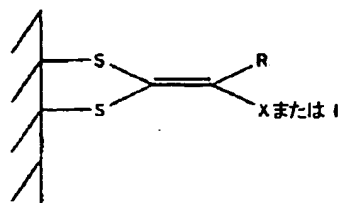
構造12



【0218】

【化13】

構造13



【0219】

構造13と同様に、3つの硫黄部で電極に結合している一つの炭素原子で終了する伝導性オリゴマーを有することが可能であることも留意すべきである。さらに本明細書に必ずしも記載されていないが、伝導性オリゴマーと絶縁体はまた「Q」末端基を含み得る。

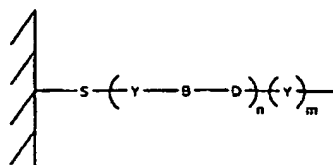
【0220】

好ましい実施態様において、電極は金電極であり、結合は当分野で既知のように硫黄結合を介しており、すなわち、A部は硫黄原子または部分である。金-硫黄結合の正確な特徴は知られていないが、この結合は本発明の目的で、共有結合と考える。代表的な構造は構造3の伝導性オリゴマーを用いて構造14に記載するが、本明細書に記載のすべての構造について、いずれの伝導性オリゴマーまたは伝導性オリゴマーの組合せも使用し得る。同様にいずれの伝導性オリゴマーまたは絶縁体も本明細書に記載の末端基を含み得る。構造14は、「A」リンカーが硫黄原子のみを含むように記載しているが、他の原子も存在し得る(すなわち、硫黄から伝導性オリゴマーへのまたは置換基へのリンカー)。さらに、構造14は、Y芳香族基に結合した硫黄原子を表わしているが、当業者に明らかであろうように、B-D基(すなわち、アセチレン)と同様に結合したものであってもよい。

【0221】

【化14】

構造 1 4



【0222】

一般的には、チオール結合が好ましい。電気泳動を使用するシステムにおいて、チオール結合は2組の電極を両方共使用する場合に好ましく(すなわち、SAMを含む検出電極は高い電気泳動電圧(すなわち800または900mVより高い)では、チオール結合が酸化されてSAMが失われるため、使用されない)、1組の電極を使用する場合は、下に概略説明するように低い電気泳動電圧を使用する。

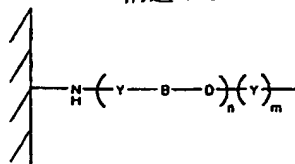
【0223】

好ましい実施態様において、電極は炭素電極、すなわち、ガラス状炭素電極であり、結合はアミン基の窒素原子を介している。代表的な構造を構造15に示す。また別の原子が存在し得、すなわち、ZタイプリンカーおよびXまたは末端基であり得る。

【0224】

【化15】

構造 1 5



【0225】

【化16】

$$\text{---} \text{O} \text{---} \text{Si} \text{---} (\text{Y} \text{---} \text{B} \text{---} \text{O})_n (\text{Y})_m$$

構造 16 において、酸素原子は金属酸化物電極の酸化物からのものである。S i 原子は他の原子を含んでもよく、すなわち、置換基含有のケイ素部分であってもよい。他の電極に対する SAM の他の付着は技術上既知である；例えば、インジウム酸化スズ電極に対する付着については Napier et al., Langmuir, 1997 参照、およびインジウム酸化スズ電極に対するリン酸エステル¹の化学吸着（CHI 会議（1998 年 5 月 4～5 日）での H. Holden Thorpe の講演）。

本発明のSAMは種々の方法、例えば、有機溶液からの析出および水性溶液からの析出などにより作製し得る。本明細書にて概説した方法では、例として金電極を使用するが、当業者が認めるように、他の金属および方法も同様に使用し得る。好適な一態様においては、インジウムスズ酸化物（ITO）が電極として用いられる。

好適な態様において、金表面をまず洗浄する。様々な洗浄手法が採用可能であり、例えば、これらに限定されるものではないが、化学的洗浄またはエッチング用試薬（ピランハ（Piranha）溶液（過酸化水素／硫酸）または王水（塩酸／硝酸））、電気化学的方法、火炎処理、プラズマ処理またはそれらの併用などである。

洗浄に続いて、金基板はSAM種に露呈する。電極がITOである場合、SAM種はリン酸エステル含有種である。この処理も様々な方法で実施し得るものであり、例えば、溶液析出、気相析出、微小接触プリンティング、スプレー析出、ニート成分を用いる析出などであるが、これらに限定されるものではない。好適

な態様では、溶液中で種々のSAM種、一般にはチオール含有種の混合物を含む析出溶液を利用する。標的被検体、特にDNAを含む混合単層は通常2工程手法を用い調製する。チオール化DNAは（一般に少なくとも1種の他の単層形成種の存在下）最初の析出工程に際し析出し、混合単層形成はDNAを含まない第2チオール溶液を加える第2工程の間に完結する。第2工程は、単層再構成を促進するための緩和な加熱を含み得るが、そのことはすべての実施態様で好ましいわけではない。

【0230】

好適な態様において、析出溶液は有機析出溶液である。この態様において、清浄金表面は清浄バイアル中に入れる。有機溶媒中の結合リガンド析出溶液は、総チオール濃度がマイクロモルと飽和の間にあるように調製する；好適な範囲は約 $1\mu\text{M}$ ないし 10mM であり、特に好ましくは約 $400\mu\text{M}$ ないし 1.0mM である。好適な態様において、析出溶液はチオール修飾DNA（すなわち、付着リンカーに付着した核酸）およびチオール希釈分子（伝導性オリゴマーまたは絶縁体であるが、後者が好ましい）を含有する。DNAと希釈剤（もしあるとすれば）との比は通常 $1000:1$ と $1:1000$ との間であり、好ましくは約 $10:1$ ないし約 $1:10$ であり、特に好ましいのは $1:1$ である。好適な溶媒はテトラヒドロフラン（THF）、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド（DMF）、エタノール、またはその混合物である；一般に、捕獲リガンドを溶解するのに十分な極性の溶媒であれば、その溶媒が表面と反応するような官能基をもたない限り、使用可能である。十分なDNA析出溶液をバイアルに加えて電極の表面を完全に覆うようにする。この金基板は外界温度または外界温度より少し高い温度で、数秒ないし数時間、好ましくは5分ないし30分間インキュベートする。最初のインキュベーション後、析出溶液を取出し、希釈分子のみの有機溶媒溶液（約 $1\mu\text{M}$ ないし 10mM 、好ましくは約 $100\mu\text{M}$ ないし約 1.0mM ）を添加する。金基板は室温または室温以上の温度で所定時間（数秒ないし数日、好ましくは約10分ないし約24時間）インキュベートする。金サンプルを溶液から取出し、清浄な溶媒中ですすいで使用する。

【0231】

好適な態様においては、水性析出溶液を用いる。上記のように、清浄金表面を清浄バイアル内に入れる。DNAの析出水性溶液は総チオール濃度が約 $1\text{ }\mu\text{M}$ と 10 mM の間、好ましくは約 $1\text{ }\mu\text{M}$ ないし $200\text{ }\mu\text{M}$ であるように調製する。水性溶液は多くの場合、塩を存在させている（飽和まで、好ましくは約 1 M である）が、精製水を使用し得る。析出溶液はチオール修飾DNAおよびしばしばチオール希釈分子を含有する。DNAと希釈剤との比は通常 $1000:1$ と $1:1000$ との間であり、好ましくは約 $10:1$ ないし約 $1:10$ であり、特に好ましいのは $1:1$ である。DNA析出溶液は電極の表面を完全に覆うような容量でバイアルに加える。この金基板を外界温度または外界温度より少し高い温度で $1\sim30$ 分間インキュベートするが、通常5分で十分である。最初のインキュベーション後、析出溶液を取出し、希釈分子のみ（ $10\text{ }\mu\text{M}$ ないし 1.0 mM ）の水性溶液または有機溶媒溶液を添加する。金基板は室温または室温以上の温度で、完全な単層が形成されるまで（ $10\text{ 分}\sim24\text{ 時間}$ ）インキュベートする。金サンプルを溶液から取出し、清浄な溶媒にすすいで使用する。

【0232】

好適な態様においては、本明細書に説明するように、回路基板が金電極用の基板として使用される。金表面上SAMの形成は、まず基板を、本明細書に記載のように、例えば、 10% 硫酸溶液中 30 秒間、デタージェント溶液、王水、プラズマなどで清浄にすることにより一般に実施する。硫酸処理に続いて、基板は、例えば、 2 個のミリ-Q水浴にそれぞれ 1 分間浸漬することにより洗浄する。この基板を次いで、例えば、窒素気流下で乾燥する。基板上に析出溶液をスポットするには、相当数の既知スポット・システムを用い、一般には基板をX-Yテーブル上に置き、調湿チャンバー中で実施する。スポット滴のサイズは基板上の電極サイズと溶液送達に使用する器具により変わる；例えば、 $250\text{ }\mu\text{M}$ サイズの電極では、 30 ナノリットルの液滴が用いられる。この容量は電極表面を完全に覆うのに十分でなければならない。液滴は室温で所定時間（秒ないし一夜であるが、 5 分間が好適）インキュベートし、次いでミリ-Q水浴中ですすぐことにより液滴を除去する。基板は次いで、好ましくは、第2析出溶液、一般に有機溶媒、好ましくはアセトニトリル中に絶縁体を含む溶液により、 45°C の浴に浸漬す

ることによって処理する。30分後、基板を取出し、アセトニトリル浴に30秒間浸漬し、次いでミリーQ水浴中30秒間浸漬する。基板を窒素気流下で乾燥する。

【0233】

好適な態様においては、検出電極はさらに捕獲結合リガンド、好ましくは共有結合により付着したリガンドを含む。本明細書において「結合リガンド」または「結合種」とは、標的被検体の存在を探查するために用いる化合物であって、標的被検体に結合する化合物を意味する。一般に、本明細書に記載された態様の殆どについて、標的被検体1分子当たり少なくとも2つの結合リガンドが存在する；すなわち、本明細書に記載の検出電極に付着する「捕獲」または「アンカー」結合リガンド（本明細書では、特に核酸結合リガンドに関して「捕獲プローブ」という）および可溶性結合リガンドであって、標的被検体に独立に結合し、直接または間接に少なくとも1個のETMを含むリガンドである。

【0234】

一般に、捕獲結合リガンドは検出を目的として、検出電極に標的被検体が付着するのを可能にする。以下により詳細に説明するように、標的被検体が捕獲結合リガンドに付着するのは直接的（すなわち、標的被検体が捕獲結合リガンドに付着する）または間接的（1種以上の捕獲伸長リガンドを使用し得る）であってもよい。

【0235】

好適な態様において、結合は特異的であり、結合リガンドは結合対の部分である。本明細書において「特異的に結合する」とは、該リガンドが、試験サンプルの被検体と他の成分または混入物とを識別するのに十分な特異性をもって被検体に結合することを意味する。しかし、当業者には明らかなように、それ程特異的ではない結合を用いても被検体を検出することが可能である；例えば、このシステムには異なる結合リガンド、例えば、異なるリガンドのアレイを使用でき、特定のどの被検体の検出も、結合リガンドのパネルへの結合の「サイン」を介するが、これは「電子の鼻」が作用する様式に類似している。この結合は、被検体が非特異結合を除去するための洗浄工程を含むアッセイの条件下でも結合したまま

であるために十分なものでなければならない。ある態様においては、例えば、ある生体分子の検出では、結合リガンドに対する被検体の結合定数は少なくとも約 $10^4 \sim 10^6 \text{M}^{-1}$ であり、好ましくは約 10^5 ないし 10^9M^{-1} であり、そして特に好ましいのは約 $10^7 \sim 10^9 \text{M}^{-1}$ である。

【0236】

当業者には明らかなように、結合リガンドの組成は標的被検体の組成に依存する。広範な被検体に対する結合リガンドが既知であるか、または既知技法を用いて容易に見出すことができる。例えば、被検体が1本鎖核酸である場合、結合リガンドは、一般に、実質的に相補的な核酸であろう。あるいは、米国特許第5, 270, 163号、第5, 475, 096号、第5, 567, 588号、第5, 595, 877号、第5, 637, 459号、第5, 683, 867号、第5, 705, 337号、および出典明示により明細書に組込まれている関連特許に概略説明されている通り、核酸「アプトマー(aptoomer)」を、任意の標的被検体と実質的に結合させるために発生させることができる。同様に、被検体は核酸結合タンパク質であってもよく、捕獲結合リガンドは1本鎖または2本鎖核酸である；あるいは、結合リガンドは、被検体が1本鎖または2本鎖核酸である場合、核酸結合タンパク質であろう。被検体がタンパク質である場合、結合リガンドは、タンパク質(とりわけ、それらの抗体またはフラグメント(FAb sなど)を含む)、小分子、または上記したアプトマーを含む。好適な結合リガンドタンパク質はペプチドを包含する。例えば、被検体が酵素である場合、適切な結合リガンドは基質、阻害剤、および酵素と結合する他のタンパク質(すなわち、多酵素(またはタンパク質)複合体の成分)を包含する。当業者には明らかなように、会合する任意の2つの分子を、被検体または結合リガンドとして、好ましくは特異的に、使用し得る。適切な被検体/結合リガンド対は、抗体/抗原、受容体/リガンド、タンパク質/核酸；核酸/核酸、酵素/基質および/または阻害剤、炭水化物(糖タンパク質および糖脂質を含む)/レクチン、炭水化物および他の結合パートナー、タンパク質/タンパク質；およびタンパク質/小分子などを含むが、これらに限定されるものではない。これらは野生型または誘導配列であってもよい。好適な態様において、結合リガンドは多量化することの知られる細胞表面受容体

、例えば、成長ホルモン受容体、グルコース輸送体（特にGLUT4受容体）、トランスフェリン受容体、表皮成長因子受容体、低密度リポタンパク質受容体、高密度リポタンパク質受容体、レプチン受容体、インターロイキン受容体（IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、およびIL-17受容体を含む）、VEGF受容体、PDGF受容体、EPO受容体、TPO受容体、毛様神経栄養因子受容体、プロラクチン受容体、およびT細胞受容体などの部分である。同様に、結合化学方法に基づく、結合パートナーの発展に関係する多くの文献がある。

【0237】

本実施態様において、結合リガンドが核酸である場合、好ましい組成と技術はWO98/20162；PCT/US98/12430；PCT/US98/12082；PCT/US99/01705；PCT/US99/01703；およびU. S. S. N. 09/135, 183；60/105, 875および09/295, 691に概略説明されており、これらすべては出典明示により本明細書の一部とする。

【0238】

捕獲結合リガンドを付着リンカー（絶縁体または伝導性オリゴマーのいずれか）に付着させる方法は、一般に当該技術分野で知られているように実施されるが、付着リンカーの組成と捕獲結合リガンドの両方に左右される。一般に、捕獲結合リガンドは官能基の使用を介して付着リンカーに付着させるが、各官能基は次いで付着に用い得るものである。付着に好適な官能基は、アミノ基、カルボキシ基、オキソ基およびチオール基である。これらの官能基は次いで直接または間接的に本明細書では「Z」で表すリンカーの使用を介して付着させ得る。リンカーは当技術分野でよく知られている；例えば、ホモまたはヘテロ二官能性リンカーがよく知られたものである（参照：1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200；出典明示により本明細書の一部とする）。好適なZリンカーは、アルキル基（置換アルキル基およびヘテロ原子部分を含むアルキル基）、短鎖アルキル基を有するエステル、アミド、

アミン、エポキシ基およびエチレングリコール、および好ましい誘導体などであり、プロピル、アセチレン、および C_2 アルケンがとりわけ好ましいが、これらに限定されるものではない。Zはスルホンアミドを形成するスルホン基であつてもよい。

【0239】

この様式で、タンパク質、レクチン、核酸、小型有機分子、炭水化物などを含む捕獲結合リガンドを付加し得る。

【0240】

好適な態様ではタンパク質性の捕獲結合リガンドを利用する。当技術分野で知られているように、相当数の技法がタンパク質性の捕獲結合リガンドを付着リンカーに付着させるのに使用し得る。ある部分をタンパク質に付加させるための広範な技術が知られている。

【0241】

好適な態様では核酸を捕獲結合リガンドとして利用する。当業者には明らかなように、下記概説のいくつかの方法を、同様の方法で非核酸システムに同じように適用することができる。

【0242】

核酸捕獲結合リガンドは、伝導性オリゴマー(メカニズム-1システム)であるか、または絶縁体であり得る「付着リンカー」を介して電極に共有結合により付着している。本明細書において「共有結合により付着した」とは、2つの部分が少なくとも1つの結合により付着していることを意味し、該結合はシグマ結合、パイ結合および配位結合を包含する。

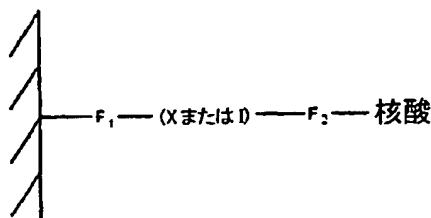
【0243】

このようにして、付着リンカーの一端を核酸(あるいは他の結合リガンド)に付着させ、他端(当業者が認めるところであるが、いずれの場合にも正確な末端である必要はない)を電極に付着させる。このように、本明細書中に描出した構造のいずれもさらに末端基として有効な核酸を含み得る。このように、本発明は、下記構造17に一般的に描出したように、電極に共有結合により付着した核酸を含む組成物を提供する。

【0244】

【化17】

構造17



構造17において、左側の斜線記号は、電極を表す。本明細書に定義するように、Xは伝導性オリゴマーであり、Iは絶縁体である。F₁は、電極および伝導性オリゴマーまたは絶縁体の共有結合をもたらす結合であり、本明細書に記載され、例えば下記に「A」と定義されるように、結合、原子またはリンカーを含む。F₂は、核酸に伝導性オリゴマーまたは絶縁体を共有結合させる結合であり、本明細書に記載のように結合、原子または結合であり得る。F₂は伝導性オリゴマーの一部、絶縁体の一部、核酸の一部であり得、または例えば本明細書で「Z」について定義するように両方に外在性であり得る。

【0245】

好適な態様において、捕獲プローブ核酸は伝導性オリゴマーを介して電極に共有結合により付着している。核酸と伝導性オリゴマーの共有結合付着は、いくつかの方法で達成することができる。好適な態様において、その付着は下記説明のように、ヌクレオシド塩基への付着によるか、核酸の主鎖（リボース、リン酸エステル、または核酸類似体主鎖の類似基）への付着によるか、または遷移金属配位子への付着による。下に概説する技法は一般に天然に存在する核酸について説明しているが、当業者も認めるように、同様の技法は核酸類似体にも使用し得、そしていくつかの場合では他の結合リガンドを使用することができる。

【0246】

好適な態様において、伝導性オリゴマーは核酸のヌクレオシド塩基に付着させる。これは下記説明のように、オリゴマーの種類に応じていくつかの方法で実施し得る。一態様において、オリゴマーは末端のヌクレオシド、すなわち、核酸の

3' または 5' ヌクレオシドに付着させる。あるいは、伝導性オリゴマーを内部ヌクレオシドに付着させる。

【0247】

塩基への付着点は塩基により異なる。一般に、いずれの位置での付着も可能である。一部の態様では、例えば、ETMを含むプローブがハイブリダイゼーション(すなわち、メカニズム-1システム)に使用される場合、相補的な塩基の水素結合に関与しない位置に付着させるのが好ましい。このように、例えば、一般に付着はウリジン、シトシンおよびチミンなどのピリミジン類の5または6位置に対するものである。アデニンおよびグアニンなどのプリン類については、結合は、好ましくは8位置を介する。非標準の塩基に対する付着は、相当する位置で好適になされる。

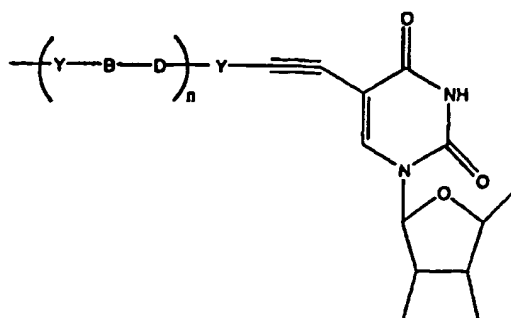
【0248】

一態様において、付着は直接的である；すなわち、伝導性オリゴマーと塩基の間に介在する原子はない。この態様において、例えば、末端アセチレン結合を有する伝導性オリゴマーを塩基に直接付着させる。構造18はこの結合の一例であり、ここでは構造3の伝導性オリゴマーと塩基としてウリジンを使用しているが、当業者も認めるように、他の塩基と伝導性オリゴマーを使用することもできる。

【0249】

【化18】

構造18



【0250】

本明細書に示したペントース構造には、水素、ヒドロキシ、リン酸またはアミノ基などの他の基が結合していることに留意すべきである。更に、本明細書に示したこのペントースおよびヌクレオシド構造は、通常表現の鏡像として非慣用的に示す。更に、ペントースおよびヌクレオシド構造はまた、任意の位置に、例えば、合成中に必要に応じて、保護基などの新たな基を含有できる。

【0251】

加えて、塩基は、必要に応じて更なる修飾を含むこともあり、即ち、カルボニルまたはアミン基を変更したり、保護することもできる。

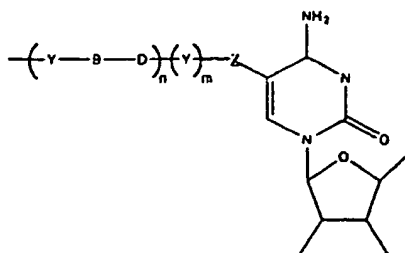
【0252】

別の実施態様では、結合は、一般に、塩基としてウリジン、および構造3のオリゴマーを用いる構造19に示したように、アミドおよびアミン結合を含む、多くの異なるZ-リンカーを介する：

【0253】

【化19】

構造19



この実施態様では、Zはリンカーである。好ましくは、Zは約1から約10原子の短いリンカーであり、1から5原子が好ましく、アルケン、アルキニル、アミン、アミド、アゾ、イミンなどの結合を含有してもよく、含有しなくてもよい。リンカーは当分野では知られており、例えば、よく知られているとおり、ホモまたはヘテロ二官能性リンカーである(1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linker, pages 155-200 参照、出典明示により本明細書の一部とする)。好ましいZリンカーには、アルキル基(置換アルキル基

およびヘテロ原子部分を含有するアルキル基を含む)があるが、これらに限定されず、好ましいのは、短いアルキル基、エステル、アミド、アミン、エポキシ基およびエチレングリコールおよび誘導体であり、特に好ましいのは、プロピル、アセチレンおよびC₂アルケンである。Zはまた、スルホン基であってもよく、下記のようにスルホンアミド結合を形成する。

【0254】

好ましい実施態様では、核酸と伝導性オリゴマーの結合は、核酸主鎖への結合を介して行う。これは、リボース-リン酸主鎖のリボースへの結合または主鎖のリン酸への結合、または類似主鎖の他の基への結合を含む多くの方法で実施できる。

【0255】

予備事項として、下記に十分説明するように、本実施態様における結合部位は、3'または5'末端ヌクレオチド、または内部ヌクレオチドであると理解されるべきである。

【0256】

好ましい実施態様では、伝導性オリゴマーをリボース-リン酸主鎖のリボースへ結合させる。これは、いくつかの方法で実施できる。当分野では知られているように、リボースの2'または3'位のいずれかにアミノ基、硫黄基、ケイ素基、リン基またはオキソ基で修飾したヌクレオシドを作成できる(Imazawa et al., J. Org. Chem., 44: 2039 (1979); Hobbs et al., J. Org. Chem. 42 (4): 714 (1977); Verheyden et al., J. Org. Chem. 36 (2): 250 (1971); McGee et al., J. Org. Chem. 61: 781-785 (1996); Mikhailopulo et al., Liebigs. Ann. Chem. 513-519 (1993); McGee et al., Nucleosides & Nucleotides 14 (6): 1329 (1995)、全て出典明示により本明細書の一部とする)。次いで、伝導性オリゴマーを加えるためにこれらの修飾ヌクレオシドを用いる。

【0257】

好ましい実施態様は、アミノ修飾ヌクレオシドを利用する。このとき、これらのアミノ修飾リボースを用いて、伝導性オリゴマーに対してアミドまたはアミン結合を形成できる。好ましい実施態様では、アミノ基を直接リボースに結合させ

るが、当業者には明らかであるように、「Z」について記載したような短いリンカーをアミノ基とリボースとの間に与えることができる。

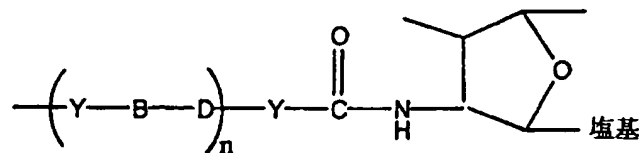
【0258】

好ましい実施態様では、リボースに結合させるためにアミド結合を使用する。好ましくは、構造1～3の伝導性オリゴマーを用いるならば、mは0であり、従って伝導性オリゴマーの末端はアミド結合である。この実施態様では、アミノ修飾リボースのアミノ基の窒素は、伝導性オリゴマーの「D」原子である。よって、本実施態様の好ましい結合を、構造20に示す(構造3の伝導性オリゴマーを用いる)。

【0259】

【化20】

構造20



当業者には明らかなように、構造20は、アミド結合として固定された末端結合を有する。

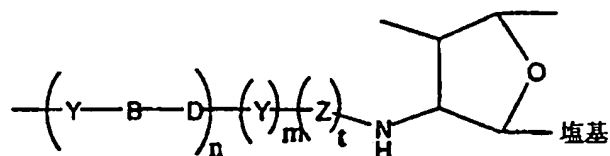
【0260】

好ましい実施態様では、ヘテロ原子結合、即ち、オキソ、アミン、硫黄等を用いる。好ましい実施態様はアミン結合を利用する。また、アミド結合について上記で概説したとおり、アミン結合の場合も構造3の伝導性オリゴマーを用いると、アミノ修飾リボースの窒素が伝導性オリゴマーの「D」原子であり得る。よって、例えば、構造21および22は、それぞれ構造3および9の伝導性オリゴマーを持つヌクレオシドを示し、ヘテロ原子として窒素を用いているが、他のヘテロ原子を使用することもできる：

【0261】

【化21】

構造 2 1

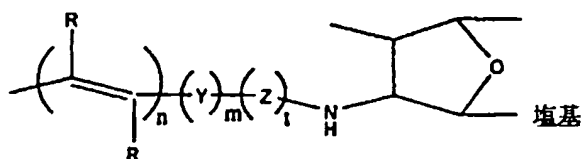


構造 2 1 では、好ましくは、 m も t も 0 ではない。ここで好ましい Z はメチレン基またはその他の脂肪族アルキルリンカーである。この位置にある 1、2 または 3 つの炭素は特に合成の際に有用である。

【0262】

【化 2 2】

構造 2 2



構造 2 2 では、 Z は上記定義のとおりである。適切なリンカーには、メチレンおよびエチレンがある。

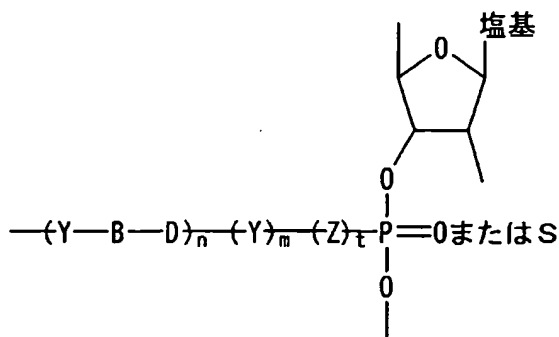
【0263】

別の実施態様では、伝導性オリゴマーを、核酸のリボース-リン酸主鎖(または類似体)のリン酸を介して核酸に共有結合させる。この実施態様では、結合は直接的か、またはリンカーまたはアミド結合を利用する。構造 2 3 は、直接結合を示しており、構造 2 4 は、アミド結合を介した結合を示している(両方とも、構造 3 の伝導性オリゴマーを利用しているが、構造 8 の伝導性オリゴマーも可能である)。構造 2 3 および 2 4 は、3' 位の伝導性オリゴマーを示しているが、5' 位も可能である。更に、構造 2 3 および 2 4 とも、天然のホスホジエステル結合を示しているが、当業者には明かなように、ホスホジエステル結合の非標準類似体も使用できる。

【0264】

【化23】

構造23



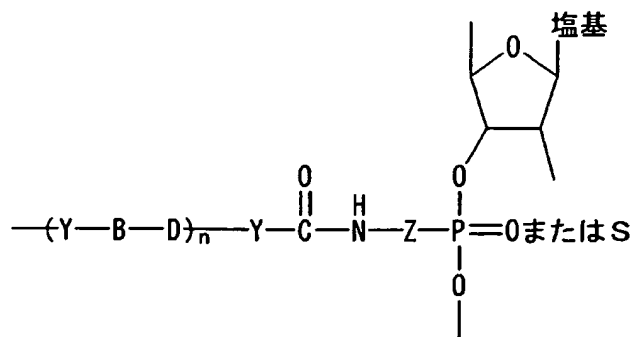
構造23中、末端にYが存在する(即ち $m=1$)場合、Zは存在しない(即ち、 $t=0$)のが好ましい。末端にYが存在しない場合、Zは存在するのが好ましい。

【0265】

構造24は、末端B—D結合がアミド結合であり、末端にYが存在せず、Zが上記定義のリンカーである好ましい実施態様を示す。

【化24】

構造24



【0266】

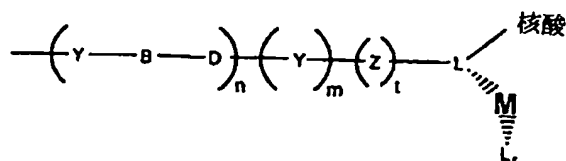
好ましい実施態様では、伝導性オリゴマーは、遷移金属の配位子を介して核酸に共有結合する。本実施態様では、伝導性オリゴマーを遷移金属に1以上の配位原子を提供する配位子に共有結合させる。一実施態様では、下記構造25に総括

的に示したように、伝導性オリゴマーが結合する配位子には、核酸も結合している。あるいは、下記構造26に総括的に示したように、伝導性オリゴマーは1つの配位子に結合しており、核酸は別の配位子に結合している。よって、遷移金属の存在下で伝導性オリゴマーは核酸に共有結合する。これらの構造はいずれも構造3の伝導性オリゴマーを示しているが、その他のオリゴマーを利用することもできる。構造25および26は、核酸用の2つの代表的な構造を示す：

【0267】

【化25】

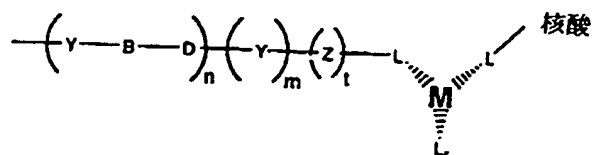
構造25



【0268】

【化26】

構造26



【0269】

本明細書記載の構造中、Mは金属原子であり、遷移金属が好ましい。本発明に使用するのに適した遷移金属はカドミウム (Cd)、銅 (Cu)、コバルト (Co)、パラジウム (Pd)、亜鉛 (Zn)、鉄 (Fe)、ルテニウム (Ru)、ロジウム (Rh)、オスミウム (Os)、レニウム (Re)、白金 (Pt)、スカンジウム (Sc)、チタニウム (Ti)、バナジウム (V)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、ニッケル (Ni)、モリブデン (Mo)、テクネチウム (Tc)、タングステン (W)、およびイリジウム (Ir) などであるが、これら

に限定されるものではない。すなわち、遷移金属の第1系列、白金族(Ru、Rh、Pd、Os、IrおよびPt)並びにFe、Re、W、MoおよびTcが好ましい。特に好ましいのはルテニウム、レニウム、オスミウム、白金、コバルトおよび鉄である。

【0270】

Lは補助配位子であり、金属イオン結合のための配位原子を提供する。当業者が認識するように、補助配位子の数と性質は金属イオンの配位数に依存する。単座、二座または多座補助配位子はどの位置で使用してもよい。従って、例えば、金属が6の配位数を有する場合、伝導性オリゴマーの末端からのL、核酸から与えられるL、およびrを6まで加える。従って、金属が六配位数の場合、rは0(全配位原子が他の2つの配位子によって与えられる場合)から4(全ての補助配位子が一座配位の場合)の範囲であろう。従って、一般に、金属イオンの配位数および他の配位子の選択に依存してrは0ないし8であるであろう。

【0271】

ある実施態様において、金属イオンは6の配位数を有し、そして伝導性オリゴマーに付着した配位子および核酸に付着した配位子は、両方共、少なくとも2量体である；すなわち、rは、好ましくは、0、1(すなわち残った補助配位子は2量体である)または2(2つの一座配位補助配位子が使用される)である。

【0272】

技術的に認識されるように、補助配位子は同一であっても異なってもよい。適切な配位子は2つの範疇に入る：配位原子(一般的には文献上、シグマ(σ)供与体という)として(金属イオンに依存して)、窒素、酸素、イオウ、炭素またはリン原子を用いる配位子、およびメタロセン配位子などの有機金属配位子(一般的には文献上、パイ(π)供与体といい、本明細書ではL_πで図示する)である。適切な窒素供与配位子は技術上周知であり、以下のものを包含するがこれらに限定されるものではない：NH₂；NHR；NRR'；ピリジン；ピラジン；イソニコチンアミド；イミダゾール；ビピリジンおよびビピリジンの置換誘導体；テルピリジンおよび置換誘導体；フェナントロリン、特に1，10-フェナントロリン(p h e nと略記)およびフェナントロリンの置換誘導体、例えば、4，

7-ジメチルフェナントロリンおよびジピリド [3, 2-a : 2', 3'-c] フェナジン (dppz と略記) ; ジピリドフェナジン ; 1, 4, 5, 8, 9, 12-ヘキサアザトリフェニレン (hat と略記) ; 9, 10-フェナントレンキノ-ジイミン (phi と略記) ; 1, 4, 5, 8-テトラアザフェナントレン (tap と略記) ; 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (cyclam と略記) 、EDTA、EGTA およびイソシアニド。融合した誘導体を包含する置換誘導体も使用することができる。ある態様においては、ポルフィリンおよびポルフィリンファミリーの置換誘導体を使用してもよい。例えば、Comprehensive Coordination Chemistry, Ed. Wilkinson et al., Pergamon Press, 1987, Chapters 13.2 (pp 73-98), 21.1 (pp 813-898) and 21.3 (pp 915-957) 参照。この文献の全部を特に参照により本明細書に取込む。

【0273】

炭素、酸素、イオウおよびリンを用いる適切なシグマ供与配位子は技術上既知である。例えば、適切なシグマ炭素供与体はCotton and Wilkenson, Advanced Organic Chemistry, 5th Edition, John Wiley & Sons, 1988に見出されるが、この文献を参照により本明細書に取込む ; 例えば、38 ページ参照。同様に、適切な酸素配位子は、クラウンエーテル、水、および技術上既知の他のものを包含する。ホスフィンおよび置換ホスフィンも適切である ; Cotton and Wilkenson の 38 ページ参照。

【0274】

酸素、イオウ、リンおよび窒素-供与配位子は、ヘテロ原子が配位原子として作動するような様式で付着する。

【0275】

好適な態様においては、有機金属配位子を用いる。レドックス部分として使用する純有機化合物、およびヘテロ環状またはエキソ環状置換基として供与原子をもつ δ -結合有機配位子との種々の遷移金属配位複合体に加えて、 π -結合有機配位子をもつ多様な遷移金属有機金属化合物が入手可能である (Advanced Inorganic Chemistry, 5th Ed., Cotton & Wilkinson, John Wiley & Sons, 1988, Chapter 26: Organometallics, A Concise Introduction, Elschenbroich et al.,

2nd Ed., 1992, VCH; および Comprehensive Organometallic Chemistry II, A Review of the Literature 1982-1994, Abel et al. Ed., Vol. 7, Chapters 7, 8, 10 & 11, Pergamon Press, 特に参照により本明細書に取込む)。かかる有機金属配位子は、シクロペンタジエニド・イオン $[\text{C}_5\text{H}_5(-1)]$ などの環状芳香族化合物および種々の環置換および環融合誘導体、例えば、インデニリド (-1) イオンなどであって、一群のビス(シクロペンタジエニル)金属化合物(すなわち、メタロセン)を産生する; 例えば, Robins et al., J. Am. Chem. Soc., 104: 1882-1893 (1982); および Gassman et al., J. Am. Chem. Soc., 108: 4228-4229 (1986) 参照; これらを出典明示により本明細書に組込まれている。これらの内、フェロセン $[(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{Fe}]$ およびその誘導体が多様な化学的 (Connelly et al., Chem. Rev. 96: 877-910 (1996), 出典明示により本明細書に組込まれている) および電子化学的 (Geiger et al., Advances in Organometallic Chemistry 23: 1-93; および Geiger et al., Advances in Organometallic Chemistry 24: 87, 出典明示により本明細書に組込まれている) 電子伝達または「レドックス」反応に使用されている原型的な例である。様々な第1、第2および第3列遷移金属のメタロセン誘導体は、核酸のリボース環またはヌクレオシド塩基のいずれかに共有結合により付着しているレドックス部分としての有力な候補である。他の潜在的に適切な有機金属配位子は、ベンゼンなどの環状アレンなどを包含し、ビス(アレン)金属化合物とその環置換および環融合誘導体を産生するが、そのビス(ベンゼン)クロミウムは原型的な例である。アリル (-1) イオンなどの他の非環状 π -結合配位子またはブタジエンは潜在的に適切な有機金属化合物を産生し、かかる配位子はすべて他の π -結合および δ -結合配位子と連携して、金属-炭素結合をもつ一般クラスの有機金属化合物を構成する。架橋有機配位子およびさらなる非架橋配位子を有し、同様に金属-金属結合を有し、また有さない、かかる化合物の種々のダイマーおよびオリゴマーの電気化学的研究は、核酸分析における有力な候補レドックス部分である。

【0276】

1種以上の補助配位子が有機金属配位子である場合、該配位子は一般に有機金属配位子の炭素原子の一つを介して付着するが、ただし付着は複素環式の配位子

に対し他の原子を介してであってもよい。好適な有機金属配位子は、置換誘導体およびメタロセンオファンを含むメタロセン配位子を包含する（上記 Cotton and Wilkenson の 1 1 7 4 ページ参照）。例えば、メチルシクロペンタジエニルなどのメタロセン配位子の誘導体、好ましくは複数のメチル基を有する例えば、ペンタメチルシクロペンタジエニルなどを用い、メタロセンの安定性を増大させることができる。好適な態様において、メタロセンの 2 つのメタロセン配位子の 1 つのみが誘導化される。

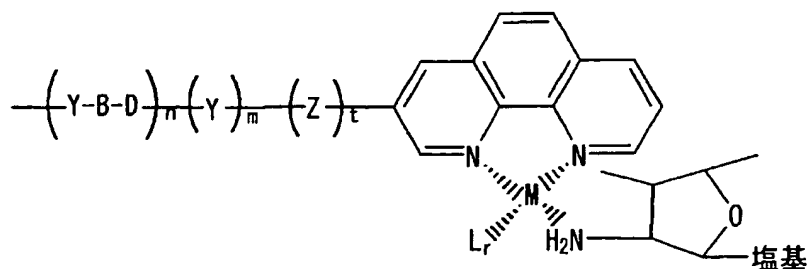
【 0 2 7 7 】

本明細書に記載のように、配位子の任意の組み合わせを使用し得る。好ましい組み合わせは：a) 全配位子が窒素供与配位子である；b) 全配位子が有機金属配位子である；そして c) 伝導性オリゴマーの末端の配位子がメタロセン配位子であり、核酸により提供される配位子は窒素供与配位子であることを含み、必要により、他の配位子と一緒にあり、それは窒素供与配位子またはメタロセン配位子またはその混合物である。これらの組み合わせは、構造 3 の伝導性オリゴマーを使用した代表例に記載され、構造 2 7 (フェナンスロリンおよびアミノを代表的配位子として使用して)、2 8 (フェロセンを金属-配位子組み合わせとして使用して) および 2 9 (シクロペンタジエニルおよびアミノを代表的配位子として使用して) に記載する。

【 0 2 7 8 】

構造 2 7

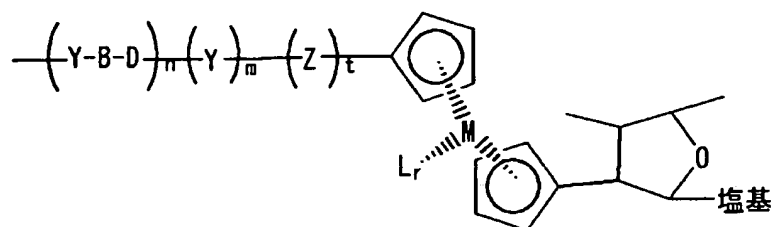
【化 2 7】



【 0 2 7 9 】

構造 2 8

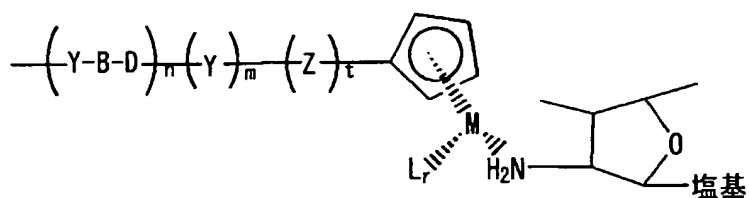
【化28】



【0280】

構造29

【化29】



【0281】

好ましい態様において、本発明で使用する配位子は、キレート化金属イオンのレドックス状態に依存して、別の蛍光特性を示す。下記のように、これは、従って、ETMと電極間の電子伝達の検出の別のモードとして作用する。

【0282】

さらに、同様の方法を使用して、タンパク質を検出電極に付着させることができる；例えば米国特許第5,620,850号参照、出典明示により本明細書に組込まれている。

【0283】

下記により詳細に示すような、好ましい態様において、核酸に結合した配位子は、リボース-リン酸主鎖のリボースの2'または3'位置に結合したアミノ基である。本配位子は、金属イオンに結合する多座配位子を形成するように、多くのアミノ基を含み得る。他の好ましい配位子は、シクロペンタジエンおよびフェナンスロリンを含む。

【0284】

核酸を結びつけるために金属イオンを用いると、システムの内部対照または目

盛として機能し、表面上の利用可能な核酸の数を測定できる。しかしながら、当業者には明らかなように、金属イオンを用いて核酸を伝導性オリゴマーに結びつける場合、下記のように、システムの残部で使用されるETMのレドックス電位とは異なるレドックス電位を、この金属イオン錯体が有しているのが、通常望ましい。これは、標的配列の存在から捕獲プローブの存在を区別し得るために一般的に正しい。これは同定、測定および／または定量化に有用である。従って、電極での捕獲プローブの量をハイブリダイズした2本鎖核酸の量と比較して、サンプル中の標的配列の量を定量化することができる。これはセンサーまたはシステムの内部対照として機能するのに非常に重要である。これにより、標的を添加する前または後のいずれにおいても、似ているが異なる対照システムに依存するよりも、むしろ検出に用いられる同一の分子上での測定が可能となる。従って、検出に使用されるであろう実際の分子を、いかなる実験にも先立ち定量化できる。これは以前の方法より重要な利点である。

【0285】

好適な態様において、捕獲プローブ核酸(または他の結合リガンド)を、絶縁体を介して電極に共有結合により付着させる。核酸(および他の結合リガンド)がアルキル基などの絶縁体に付着することは周知であり、それらの付着は、塩基、またはリボースまたはリン酸エステル部分を含む主鎖に対して、または核酸類似体の代替主鎖に対して実施し得る。

【0286】

好適な態様においては、表面上に1種またはそれ以上の異なる捕獲プローブ種があってもよい。一部の態様においては、以下により詳細に説明するように、そこには捕獲プローブの1タイプまたは捕獲伸長プローブの1タイプがあってもよい。あるいは、異なる捕獲プローブ、または多様な異なる捕獲伸長プローブをもつ1種の捕獲プローブを用いることもできる。同様に、(特にメカニズム-2システムでの核酸被検体および結合リガンドの場合)比較的短いプローブ配列を含む補助捕獲プローブを使用することが望ましく、これはシステムの成分、例えば、リクルートリンカーを「取押さえる」のに使用し、表面でのETM濃度を上げることができる。

【0287】

このように、本発明は標的被検体検出システムに有用な、単層と捕獲結合リガンドを含む、少なくとも1つの検出電極を含む基質を提供する。

【0288】

好適な態様においては、該組成物はさらに溶液あるいは溶解性結合リガンドを含むが、メカニズム-1システムについて下に詳記したように、ETMを、非共有的に付着したハイブリダイゼーション指示体の形態で添加してもよい。溶液結合リガンドは、好ましくは特異的に、標的被検体に結合する点で捕獲結合リガンドに似ている。溶液結合リガンドは捕獲結合リガンドと同一でもまたは異なってもよい。一般に、溶液結合リガンドは、図5Aに描出したような場合もあるが、直接表面に結合するものではない。溶液結合リガンドは少なくとも1つのETM(図4A)を含むリクルートリンカーを直接含むか、またはリクルートリンカーが溶液結合リガンドと直接的(図4A)にまたは間接的(図4F)に結合する。

【0289】

このように、共有結合的に付着したETMを含むリクルートリンカーを有する、「溶液結合リガンド」または「溶解性結合リガンド」または「シグナル担体」または「標識プローブ」または「標識結合リガンド」が提供される。すなわち、標識プローブまたは溶液結合リガンドのある部分が、直接的または間接的に、標的被検体と結合しており、そしてある部分が共有結合的に付着したETMを含むリクルートリンカーを含む。いくつかのシステム、例えばメカニズム-1核酸システム中では、これらは同一であってもよい。同様に、メカニズム-1において、リクルートリンカーは、検出プローブとハイブリダイズし得る核酸を含む。「電子供与体部分」、「電子受容体部分」、および「ETM」(ETM)という用語または文法的均等物は、一定の条件下で電子伝達し得る分子をいう。電子供与体および電子受容体の許容力は相対的であるということは理解されるべきである；すなわち、一定の実験条件下で電子を失う分子が、異なる実験条件下で電子を受容し得る。可能な電子供与体部分と電子受容体部分の数は非常に多く、また、電子転移化合物の当業者であれば本発明において多くの化合物を利用し得るであろう、ということも理解されるべきである。好適なETMとは、遷移金属錯体、

有機ETM、および電極であるが、これらに限定されるものではない。

【0290】

好適な態様において、ETMは遷移金属錯体である。遷移金属とはその原子が部分的または完全な電子のd殻を有するものである。本発明に使用する適切な遷移金属は上に列記してある。

【0291】

遷移金属は上記定義の様々な配位子Lと錯体を形成し、当該技術上周知のように、適切な遷移金属錯体となる。

【0292】

遷移金属錯体に加えて、他の有機電子供与体および受容体は、本発明に使用する核酸に共有結合により付着していてもよい。これらの有機分子は、リボフラビン、キサンテン色素、アジン色素、アクリジンオレンジ、N, N'-ジメチル-2, 7-ジアザピレニウム・ジクロリド (DAP²⁺)、メチルピオロジェン、臭化エチジウム、キノン類、例えば、N, N'-ジメチルアントラ(2, 1, 9-def, 6, 5, 10-d'e'f')ジイソキノリン・ジクロリド (ADIQ²⁺)；ポルフィリン（[メソーテトラキス(N-メチル-x-ピリジニウム)ポルフィリン・テトラクロリド]）、ベルラミン・ブルーB塩酸塩、ビンドシェドラー (Bindschedler) グリーン；2, 6-ジクロロインドフェノール、2, 6-ジブロモフェノールインドフェノール；ブリリアント・クレストブルー（塩化3-アミノ-9-ジメチルアミノ-10-メチルフェノキシアジン）、メチレンブルー；ナイルブルーA（アミノアフトジエチルアミノフェノキシアジン硫酸塩）、インジゴ-5, 5', 7, 7'-テトラスルホン酸、インジゴ-5, 5', 7-トリスルホン酸；フェノサフラニン、インジゴ-5-モノスルホン酸；サフラニンT；塩化ビス（ジメチルグリオキシマト）鉄（II）；インデュリンスカーレット、ニュートラルレッド、アントラセン、コロネン、ピレン、9-フェニルアントラセン、ルブレン、ピナフチル、DPA、フェノチアジン、フルオランテン、フェナントレン、クリセン、1, 8-ジフェニル-1, 3, 5, 7-オクタテトラセン、ナフタレン、アセナフタレン、ペリレン、TMPDおよびこれら化合物の類似体と置換誘導体であるが、これらに限定されるものではない。

【0293】

一態様において、電子供与体および受容体は技術上既知のレドックスタンパク質である。しかし、多くの態様においてレドックスタンパク質は好ましくない。

【0294】

一態様において、特に電気泳動工程を用いる場合、ETMは、好ましくは標的被検体が帯電していない場合、帯電した分子であるものが選択される。このように、例えば、多数の帯電したETMを直接または間接に含む溶液結合リガンドを電気泳動に先立ち標的被検体に結合させ、標的被検体が電界内で移動するのに十分な電荷をもつようにし、結果として電荷と検出部分を与える二重の目的を実現させ得る。このように、例えば、帯電したETMを含む標識プローブが使用可能であり、標的被検体に直接結合する、または増幅プローブなどの中間体種に結合するプローブが使用できる。あるいは、他の帯電種をETMに加えて付加し得る。あるいは、これらの電荷種はこのシステムの不可欠な部分でもあり得る；例えば、標識プローブの部分がポリリジンのような帯電ポリマーであってもよい。しかし、この態様において、非特異的に結合した標識プローブの検出表面移動は非特異シグナルの増大に至ることにもなる。従って、この態様において、電気泳動後に逆電界（一般には逆極性のパルス）を使用すると、非特異的に結合した標識プローブを検出プローブ表面から追い出したりは放出するに至り、バックグラウンドの非特異的シグナルを減少させる。

【0295】

特異ETMの選択は、以下に一般的に概説するように、使用する電子伝達検出のタイプにより影響を受ける。好適なETMはメタロセンであり、特に好ましいのはフェロセンとその誘導体である。

【0296】

好適な態様においては、複数のETMが使用される。実施例に示すように、多様なETMの使用はシグナルの増幅につながり、より感度の高い検出限界を可能とする。以下に検討するように、相補鎖にハイブリダイズする核酸上で複数のETMを使用すると、その数、付着の部位および複数ETM間の空間関係に依存してハイブリダイゼーション複合体の T_m の減少を引起す。一方、それはETMが

リクルートリンカー上にある（すなわち、「メカニズム-2」）場合、要因ではなくなる。なぜなら、それが相補配列にハイブリダイズしないからである。従って、複数のETMが好ましく、リクルートリンカー当たり少なくとも約2個のETMが好ましく、また少なくとも10個が特に好ましく、また少なくとも約20～50個がとりわけ好ましい。ある事例では、非常に多くのETM（50ないし1000個）が使用可能である。

【0297】

このように、共有結合付着したETMをもつ溶液結合リガンドまたは標識プローブが提供される。ETMを溶液結合リガンドに付着させる方法は、検出様式（すなわち、メカニズム-1または2のシステム）および溶液結合リガンドの構成物に依存して変化する。以下により詳細に説明するように、メカニズム-2システムにおいて、ETMを含む溶液結合リガンド（または標識プローブ）の部分は「リクルートリンカー」といい、核酸または非核酸から構成されていてもよい。メカニズム-1システムの場合、リクルートリンカーは核酸でなければならない。

【0298】

このように、当業者が認めるように、使用し得る多様な構成が存在し得る。好適な態様において、リクルートリンカーは核酸（類似体も含む）であり、ETMの付着は、下記に示すように、（1）塩基；（2）主鎖、例えば、リボース、リン酸エステル、または核酸類似体の相当する構造；（3）下記のヌクレオシド置換；または（4）下記のごときメタロセンポリマー；を介する。好適な態様において、リクルートリンカーは非核酸であり、メタロセンポリマーまたはETM置換基を含むアルキル型ポリマー（以下により詳細に説明するように、ヘテロアルキルを含む）であってもよい。これらの選択肢は図7に一般的に描出する。

【0299】

好適な態様において、リクルートリンカーは核酸であり、共有結合により付着したETMを含んでいる。ETMは様々な位置で核酸内のヌクレオシドに付着していてもよい。好適な態様は、（1）ヌクレオシド塩基への付着、（2）塩基置換体としてのETMの付着、（3）リボース-リン酸主鎖のリボースまたはリン

酸部分への、または核酸類似体の類似構造へなどの核酸主鎖への付着、および（4）メタロセンポリマーを介しての付着、などであるが、これらに限定されるものではない。

【0300】

さらに、下記のように、リクルートリンカーが核酸である場合、第2の標識プローブを用いることが望ましく、該プローブは本明細書に定義のように第1標識プローブの一部にハイブリダイズする第1部分とリクルートリンカーを含む第2部分を有する。これは一般的に図6Qおよび6Rに図示される；これは増幅プローブの使用に似ているが、第1および第2標識プローブ両者がETMを含む場合は例外である。

【0301】

好適な態様において、伝導性オリゴマーの付着のために、既に一般的に概説されているようにヌクレオシドの塩基に付着する。付着は内部ヌクレオシドまたは末端ヌクレオシドに対してなされる。

【0302】

共有結合による塩基への付着は選定されたETM上の部分に依存するが、一般には上記されているように、伝導性オリゴマーが塩基に付着するのに似ている。付着は、一般には、塩基のどの部位になされてもよい。好適な態様において、ETMは遷移金属錯体であり、かくして、適切な金属配位子の塩基への付着がETMの共有結合による付着に導く。あるいは、当業者が認識するように、同様のタイプの結合を有機ETMの付着に使用してもよい。

【0303】

一態様において、シトシンのC4付着アミノ基、アデニンのC6付着アミノ基、またはグアニンのC2付着アミノ基が遷移金属配位子として使用し得る。

【0304】

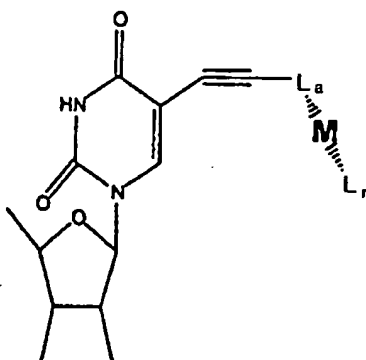
芳香族基を含む配位子は技術上既知のようにアセチレン結合を介して付着することができる（Comprehensive Organic Synthesis, Trost et al., Ed., Pergamon Press, Chapter 2.4; Coupling Reactions Between sp^2 and sp Carbon Centers, Sonogashira, pp 521-549, and pp 950-953参照；出典明示により本明細書

に組込まれている)。構造30は金属イオンと他の必要な配位子存在下での代表的な構造を図示する；構造30ではウリジンを図示しているが、本明細書全体について、他の塩基を使用することも可能である。

【0305】

【化30】

構造30



L_a は配位子であり、窒素、酸素、イオウまたはリン供与配位子またはメタロセンリガンドなどの有機金属配位子を包含する。適切な配位子 L_a はフェナントロリン、イミダゾール、bpyおよびterpyなどであるが、これらに限定されるものではない。 L_r およびMは上記定義のとおりである。再度、当業者が認識するように、リンカー（「Z」）はヌクレオシドとETMの間に含まれる。

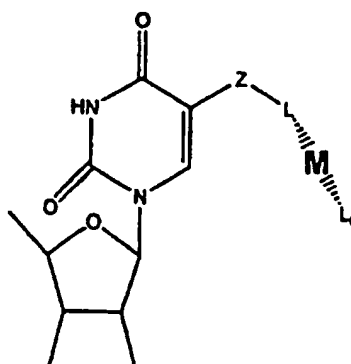
【0306】

同様に、伝導性オリゴマーに関しては、その結合がリンカーを用いてなされるが、リンカーはアミド結合を利用することができる（一般的に、Telser et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 7221-7226 (1989); Telser et al., J. Am. Chem. Soc. 111: 7226-7232 (1989)参照；両文献を特に出典明示により本明細書に組込まれている）。これらの構造は下記構造31に一般的に図示する。再度ここではウリジンを塩基として使用しているが、上記同様、他の塩基も使用し得る。

【0307】

【化31】

構造31



この態様において、Lは上記定義の配位子であり、L_rおよびMも上記定義のとおりである。好ましくは、Lはアミノ、phen、bypおよびterpyである。

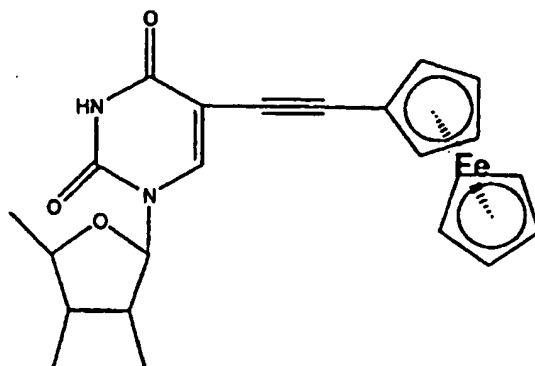
【0308】

好適な態様において、ヌクレオシドに付着したETMはメタロセンである；すなわち、構造31のLおよびL_rは両者ともメタロセン配位子であり、上記のL_rである。構造32は好適な態様を図示するものであり、この場合メタロセンはフェロセン、塩基はウリジンであるが、他の塩基も使用可能である。

【0309】

【化32】

構造32



予備データが示唆するところでは、構造32は環化可能であって、第2アセチ

レン炭素原子がカルボニル酸素を攻撃し、フラン様構造を形成する。好適なメタロセンはフェロセン、コバルトセンおよびオスミウムオセンなどである。

【0310】

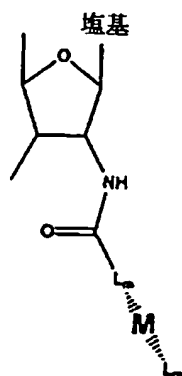
好適な態様において、ETMは核酸のリボース-リン酸主鎖のいずれかの位置、すなわち、5'または3'末端またはいずれかの内部ヌクレオシドでリボースに付着している。この場合のリボースはリボース類似体を包含する。技術的に知られているように、リボースの2'または3'位置のいずれかで修飾されているヌクレオシドは、窒素、酸素、イオウおよびリン含有修飾により可能となり得る。アミノ修飾および酸素修飾リボースが好ましい。一般的には、PCT公開WO95/15971（出典明示により本明細書に組込まれている）を参照されたい。これらの修飾基は遷移金属配位子として、または他の遷移金属配位子および有機金属配位子付着のための化学的に官能性の部分、または当業者認知の有機電子供与体部分として使用することができる。この態様において、本明細書において「Z」として図示したようなリンカーも同様に、あるいはリボースとETM間の伝導性オリゴマーも使用可能である。好適な態様では、リボースの2'または3'位での付着を利用するが、2'位置が好ましい。このように例えば、構造13、14および15に図示された伝導性オリゴマーはETMに置換えることができる；あるいは、ETMは伝導性オリゴマーの遊離末端に加えてもよい。

【0311】

好適な態様において、メタロセンはETMとして作動し、下記構造33に図示するようにアミド結合を介して付着する。例示ではメタロセンがフェロセンである場合の好適な化合物につきその合成を概説する。

【化33】

構造33

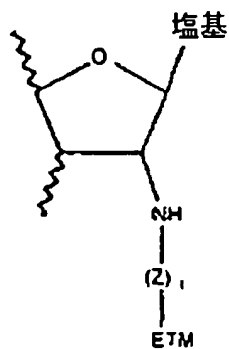


【0312】

好適な態様においては、アミンの結合が構造34に一般的に図示するように使用される。

【化34】

構造34



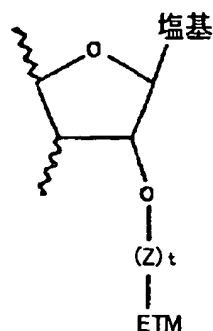
Zは本明細書に定義のごときリンカーであり、1～16原子のものが好ましく、2～4原子がとりわけ好ましい。tは1または0である。

【0313】

好適な態様においては、オキソ結合が構造35に一般的に図示するように使用される。

【化35】

構造35



構造35において、Zは本明細書に定義のとりのリンカーであり、tは1または0である。好適なZリンカーは、 $(\text{CH}_2)_n$ および $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ などのヘテロアルキル基を含むアルキル基を包含し、nは1ないし10が好ましく、n=1ないし4がとりわけ好ましく、n=4が特に好ましい。

【0314】

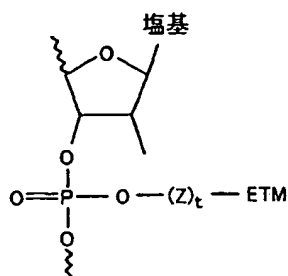
他のヘテロ原子を利用する結合も可能である。

【0315】

好適な態様において、ETMは核酸のリボースーリン酸主鎖のいずれかの位置でリン酸エステルに付着する。これは様々な様式でなされる。一態様において、ホスホジエステル結合類似体、例えば、ホスホラミドまたはホスホラミダイト結合は核酸中に取り込まれていてもよく、その場合、ヘテロ原子（すなわち、窒素）が遷移金属配位子として作動する（PCT公開WO95/15971参照；出典明示により本明細書に組込まれている）。あるいは、構造23および24に図示されている伝導性オリゴマーをETMに置換えてもよい。好適な態様において、組成物は構造36に示した構造を有する。

【化36】

構造36



【0316】

構造36において、ETMはリン酸エステル結合を介して、一般にはリンカーZを使用することにより付着する。好適なZリンカーは、 $(CH_2)_n$ 、 $(CH_2CH_2O)_n$ などのヘテロアルキル基を含むアルキル基を包含し、nは1ないし10が好ましく、n=1ないし4がとりわけ好ましく、n=4が特に好ましい。

【0317】

メカニズム-2システムにおいて、ETMがヌクレオシドの塩基または主鎖に付着している場合、より詳しく下に概説するように、「樹枝状」構造を介してETMを付着させることが可能である。図37に一般的に示すように、アルキルベースのリンカーを用い、各枝の末端に1個以上のETMを含む多数の分枝構造を創り出すことができる。一般に、これは多数のヒドロキシ基を含む分枝点を創り出すことにより実施されるが、このヒドロキシ基を用いてさらなる分枝点を加えることができる。一般的にはヌクレオシド置換およびメタロセンポリマー反応のために以下に実施するように、末端のヒドロキシ基を次いでホスホラミダイト反応に用い、ETMに加えることができる。

【0318】

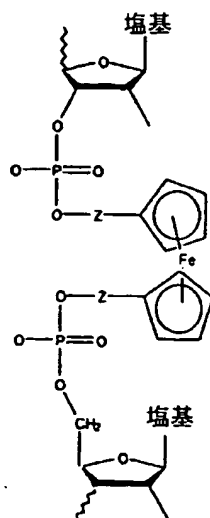
好適な態様において、メタロセンなどのETMは、ETMとして作動するように「ヌクレオシド置換体」として使用する。例えば、フェロセンの2つのシクロペンタジエン環の間の距離は、2本鎖核酸中の2つの塩基間の直交距離に類似している。フェロセンに加え、他のメタロセン、例えば、コバルトまたはルテニウムなどを含むメタロセンなどの空気安定性メタロセンを使用することができる。このように、メタロセン部分は、構造37（リボース-リン酸主鎖を有する核酸

）および構造 38（ペプチド核酸主鎖）に一般的に図示するように、核酸の主鎖に取込んでもよい。構造 37 および 38 ではフェロセンを図示しているが、当業者が認識するように、他のメタロセンも同様に使用し得る。一般に、空気に安定なメタロセンが好ましく、金属としてルテニウムおよびコバルトを利用するメタロセンが包含される。

【0319】

【化37】

構造37

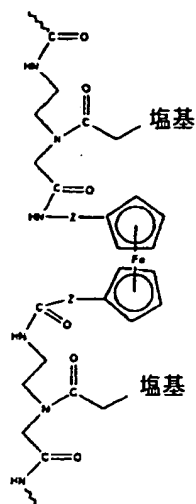


構造 37 において、Z は上記定義のリンカーであり、一般的には短いアルキル基をもち、酸素などのヘテロ原子を含むものが好ましい。一般に、重要なことはリンカーの長さであり、より詳しく以下に説明するように、2 本鎖核酸の混乱が最小になるようにする。このように、メチレン、エチレン、エチレングリコール、プロピレンおよびブチレンがすべて好適であり、エチレンおよびエチレングリコールが特に好ましい。さらに、各 Z リンカーは同一であっても、異なってもよい。構造 37 はリボース-リン酸主鎖を表示しているが、当業者が認識するように、リボース類似体およびリン酸エステル結合類似体などの核酸類似体を使用してもよい。

【0320】

【化38】

構造38



構造38において、好適なZ基は上記掲載のとおりであるが、再度、各Zリンカーは同一または異なってもよい。上述のように、他の核酸類似体も同様に使用し得る。

【0321】

さらに、上記の構造と検討ではメタロセン、特にフェロセンを描出しているが、同じ一般的な着想を用い、下記のように、ヌクレオシドの置換体として、またはポリマーの態様において、メタロセンに加えてETMを付加することができる。このように、例えば、1、2または3個（またはそれ以上）の配位子を含む、メタロセン以外の遷移金属錯体である場合、該配位子をフェロセンについて表現したように機能化し、ホスホラミダイト基の付加を可能とすることができる。特に、この態様において好ましいのは、少なくとも2つの環（例えば、アリールおよび置換アリール）配位子を含む複合体であり、その場合、各配位子はホスホラミダイト化学による付着のための官能基を含む。当業者が認識するように、このタイプの反応は、核酸主鎖の一部としてまたは核酸の「側鎖基」としてETMのポリマーを創出し、ここで生じるシグナルの増幅を可能とするが、このタイプの反応を、正しい化学基を含むように官能化し得る実質的にいずれのETMによっ

でも実施することができる。

【0322】

このように、フェロセンなどのメタロセン（または他のETM）を核酸の主鎖に挿入することにより、核酸類似体が調製される；すなわち、本発明は少なくとも1個のメタロセンを含む主鎖をもつ核酸を提供する。これは、主鎖に付着した、すなわち、リボース、リン酸エステルなどを介して、メタロセンを有する核酸から識別される。すなわち、伝統的な核酸または類似体から造られた2つの核酸（この場合の核酸は単一のヌクレオシドを包含する）それぞれは、メタロセンを介して互いに共有結合により付着することができる。異なる観点で、メタロセン誘導体または置換メタロセンが提供されるが、その場合は、メタロセンの2つの芳香環それぞれが核酸置換基を有する。

【0323】

さらに、より詳しく以下に説明するように、間にヌクレオチドをもつか、および／または隣接するメタロセンをもつ1個より多いメタロセンを主鎖に取込ませることが可能である。隣接するメタロセンを主鎖に付加する場合、これは「メタロセンポリマー」としての下記の工程と同じである；すなわち、主鎖内にメタロセンポリマーの領域が存在する。

【0324】

核酸置換基に加え、ある場合には、メタロセン（またはETM）の芳香環の一方または双方にさらなる置換基を付加することが望ましい。例えば、これらのヌクレオシド置換体は一般に実質的に相補的な核酸、例えば、標的配列またはもう一つのプローブ配列とハイブリダイズすべきプローブ配列の部分なので、置換基をメタロセン環に付加して、反対鎖上の1個または複数個の塩基に水素結合形成するのを容易にすることが可能である。これらはメタロセン環上のどの位置に付加してもよい。適切な置換基は、アミド基、アミン基、カルボン酸、および置換アルコールを含むアルコール類であるが、これらに限定されるものではない。さらに、これらの置換基は同様にリンカーを介して付着させることができるが、一般的には好ましくない。

【0325】

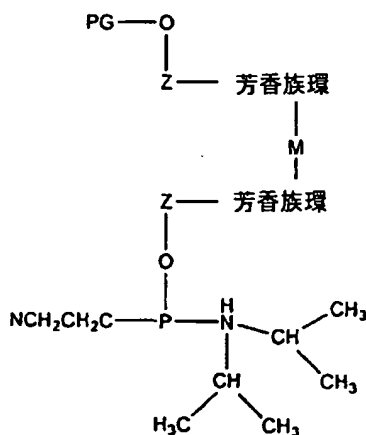
さらに、ETM、特にフェロセンなどのメタロセン上に置換基を付加してETMのレドックス性を変化させてもよい。このように、例えばある態様では、より詳しく以下に記載するように、異なる様式で（すなわち、塩基またはリボース付着）、異なるプローブ上、または異なる目的で（例えば、目盛または内部基準として）付着した異なるETMを有することが望ましい。このように、メタロセン上に置換基を付加することは、2つの異なるETMの識別を可能とする。

【0326】

これらのメタロセン主鎖核酸類似体を生成させるために、中間成分も提供される。このように、好適な態様において、本発明は構造39に一般的に表示するように、ホスホラミダイト・メタロセンを提供する。

【化39】

構造39



【0327】

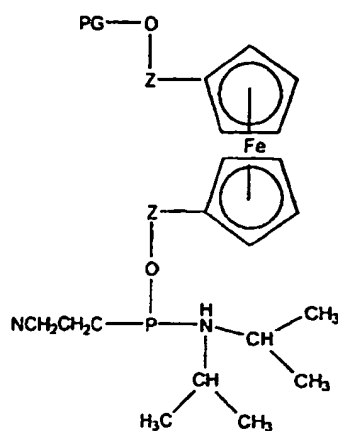
構造39において、PGは保護基であり、一般に核酸の合成に適した基であって、DMT、MMTおよびTMTなどがすべて好適である。芳香環はメタロセンの環であるか、または遷移金属錯体もしくは他の有機ETM用配位子の芳香環であることができる。芳香環は同一または異なってもよく、また、本明細書に検討するように置換されていてもよい。

【0328】

構造40はフェロセン誘導体を図示する：

【化40】

構造40



【0329】

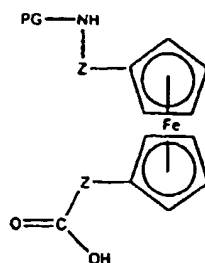
これらのホスホリミダイト類似体は技術上既知の標準的オリゴヌクレオチド合成に追加することができる。

【0330】

構造41はフェロセンペプチド核酸（PNA）モノマーを図示し、技術上既知のPNAの合成に追加することができる。

【化41】

構造41



構造41において、PG保護基はペプチド核酸合成に使用するのに適しており

、MMT、boc、およびFmocなどが好ましい。

【0331】

これら同一の中間化合物を用いてETMまたはメタロセンポリマーを形成することが可能であり、これらは、より詳しく以下に説明するように、主鎖置換体としてよりもむしろ核酸に付加される。

【0332】

好適な態様において、とりわけメカニズム-2システムの使用については、ETMはポリマーとして、例えば、メタロセンポリマーとして、本明細書および米国特許番号第5, 124, 246号に概説されているように、「分枝したDNA」態様と同様の「分枝した」構成で、修飾した機能化ヌクレオチドを用い付着させる。一般的な着想は以下のとおりである。修飾されたホスホラミダイトヌクレオチドが生成されるが、それはメタロセンなどのホスホラミダイトETMの付着に使用し得る遊離のヒドロキシ基を最終的に含むことができる。この遊離のヒドロキシ基は塩基またはリボースもしくはリン酸エステルなどの主鎖上に存在し得る（当業者も認識するであろうが、他の構造を含む核酸類似体も使用し得る）。修飾されたヌクレオチドを核酸に取込み、ヒドロキシ保護基を除去し、遊離のヒドロキシを生じる。構造39および40において上述したように、メタロセンなどのホスホラミダイトETMの付加に基づき、メタロセンETMなどのETMを付加する。メタロセンなどのさらなるホスホラミダイトETMを付加し、図9でフェロセンについて描写したように「メタロセンポリマー」を含む「ETMポリマー」を形成することができる。さらに、ある態様においては、図9に一般的に描出したように、「キャッピング」基をポリマー中の末端ETMに、例えば、最終リン酸エステル基をメタロセンに付加することによりポリマーの溶解性を上昇させることが望ましい。他の適切な溶解度上昇性「キャッピング」基は当業者が認識するであろう。留意すべきことは、これらの溶解度上昇性基は、配位子の環（例えば、本明細書で検討したメタロセン）を含む他の位置でポリマーに付加させることができることである。

【0333】

この一般的な着想の好適な態様を図面に概説する。この態様において、ホスホ

ラミダイトヌクレオチドのリボースの2'位置を、この場合はオキソ結合を介して保護されたヒドロキシ基を含むようにまず官能化するが、リンカーの数については、2リンカーについて本明細書で一般的に記載するようにいずれの数も使用し得る。保護修飾されたヌクレオチドは、次いで標準的なホスホラミダイトの化学によって、伸長している核酸中に取込む。保護基を除去し、遊離のヒドロキシ基を用い、再び標準的なホスホラミダイトの化学を用い、フェロセンなどのホスホラミダイトメタロセンを付加させる。同様の反応は核酸の類似体についても可能である。例えば、構造41に示したペプチド核酸とメタロセンモノマーを用い、メタロセンポリマーを含むペプチド核酸構造を生成させることができる。

【0334】

このように、本発明は図8および9に一般的に図示したように、メタロセンポリマーの「分枝」を含む核酸のリクルートリンカーを提供する。好適な態様ではメタロセンの長さが1ないし約50個、好ましくは約5ないし約20個、とりわけ好ましくは約5ないし約10個のメタロセンポリマーを利用する。

【0335】

さらに、リクルートリンカーが核酸である場合、任意の組合わせでETMの付着がなされる。一般的には、本明細書で概略するように、メカニズム-1システムを使用する場合、ETMを含むヌクレオチドのクラスターによって、標的配列に対するプローブのハイブリダイゼーションのT_mを減少させることができる；従って、一般的に、メカニズム-1システムでは、ETMは、配列の全長にわたって介在するか、またはそれらの少数が使用される。

【0336】

メカニズム-1では、非共有的に付着したETMを使用することができる。ある実施態様では、ETMはハイブリダイゼーション指示体である。ハイブリダイゼーション指示体は、ETM（加えると2本鎖核酸と選択的に通常は可逆的に会合する）として働き、これはMillan et al., Anal. Chem. 65:2317-2323 (1993) ; Millan et al., Anal. Chem. 66:2943-2948 (1994) と同様の方法であり、両方とも引用して明示的に本明細書の一部とする。この実施態様では、ETMの局部濃度の増加（ETMハイブリダイゼーション指示体と2本鎖核酸との表面での会

合による)を、伝導性オリゴマーを含む単層を使用してモニターすることができる。ハイブリダイゼーション指示体は、インターカレーターとマイナーグループおよび/またはメジャーグループ結合部分を含む。好ましい実施態様では、インターカレーターを使用してもよい;挿入(インターカレーション)は、一般的に、2本鎖核酸の存在下でのみ起こるので、2本鎖核酸の存在下でのみETMは濃縮される。遷移金属錯体ETMの挿入は、当業者に知られている。同様に、メチレンブルーなどのメジャーグループまたはマイナーグループ結合部分を本実施に使用してもよい。

【0337】

さらに、本発明の結合促進システムを、標的被検体の電気化学的検出に依存するいずれの方法で、実質的に使用してもよく、核酸検出に特に有用である。例えば、本発明の方法および組成物を、標的被検体に固有のETMの検出に依存する核酸検出方法で 사용할 ことができる。例えば、Napier et al., Bioconj. Chem., 8:906 (1997) (引用して明示的に本明細書の一部とする)で概略説明されているように、核酸のグアニン塩基を、酸化還元状態の変化(すなわち、ルテニウム錯体によるグアニン酸化)によって検出することができる。同様に、本発明の方法は、銅表面を触媒電極として利用して核酸のリボースを酸化する検出システムでの使い道も有用である。

【0338】

好適な態様において、リクルートリンカーは核酸ではなく、代りにいかなる種類のリンカーまたはポリマーであってもよい。当業者が認識するように、ETMを含むように修飾し得る一般的なリンカーまたはポリマーを用いることができる。一般に、ポリマーまたはリンカーは適度に溶解すべきであり、ETM付加のための適切な官能基を含むべきである。

【0339】

本明細書にて用いる場合、「リクルートポリマー」とは共有結合により付着している少なくとも2または3個のサブユニットを含む。モノマーサブユニットの少なくともある部分はETMの共有結合による付着のための官能基を含む。ある態様において、カップリング部分を、サブユニットとETMとを共有結合させる

ために用いる。付着のための好適な官能基は、アミノ基、カルボキシ基、オキソ基およびチオール基などであって、アミノ基が特に好ましい。当業者が認識するように、多様なリクルートポリマーが可能である。

【0340】

適切なリンカーとしては、アルキルリンカー（ヘテロアルキル（（ポリ）エチレングリコール型構造を含む）、置換アルキル、アリールアルキルリンカーを含む）を包含するが、これらに限定されるものではない。ポリマーについては上記のごとく、リンカーはETM付着のための1個以上の官能基を含み、付着は当業者認識のとおり、例えば、周知のホモまたはヘテロ二官能性リンカーを使用することによって実施される（1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200 参照。出典明示により本明細書の一部とする）。

【0341】

適切なリクルートポリマーは、機能化したスチレン、例えば、アミノスチレン、機能化したデキストラン、およびポリアミノ酸などを包含するが、これらに限定されるものではない。好適なポリマーは、ポリリジンなどのポリアミノ酸（ポリ-D-アミノ酸およびポリ-L-アミノ酸両方）、およびリジンと特に好適な他のアミノ酸を含むポリマーなどである。上記概略のように、ある実施態様では、荷電したリクルートリンカーが好ましい（例えば非荷電標的被検体を検出する場合など）。他の適切なポリアミノ酸は、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、リジンとグルタミン酸またはアスパラギン酸との共重合体、リジンとアラニン、チロシン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファン、および/またはプロリンとの共重合体などである。

【0342】

好適な態様において、リクルートリンカーには上記のようにメタロセンポリマーが含まれる。

【0343】

標識プローブ第1部分（すなわち、標的被検体に直接的または間接的のいずれかで結合する部分）へのリクルートリンカーの付着は、当業者が認識するように

、リクルートリンカーの組成に依存する。リクルートリンカーが核酸である場合、付着は、一般に、要求されるETM含有ヌクレオシドの取込みとともに、標識プローブの第1部分の合成の際に形成される。あるいは、標識プローブの第1部分とリクルートリンカーが別個に造られ、次いで付着してもよい。例えば、相補性の重なり合う区分があって、例えば、技術的に既知のソラレンを使用することにより、化学的に架橋し得る2本鎖核酸の区分を形成させてもよい。

【0344】

非核酸リクルートリンカーを使用する場合、リクルートリンカーのリンカー／ポリマー付着は一般に、当業者が認識するような標準的化学技法を用いて実施される。例えば、アルキルベースのリンカーを使用する場合、付着は核酸への絶縁体付着と同様である。

【0345】

さらに、核酸と非核酸の混合物であるリクルートリンカーを、線状形態（すなわち、核酸セグメントがアルキルリンカーとともに結合している）または分枝形態（ETMを含み、かつ、さらに分枝していてもよいアルキル「分枝」をもつ核酸）で入手することが可能である。

【0346】

好適な態様において、例えば標的被検体が核酸である場合、ETMを担持するのは、標識プローブのリクルートリンカーよりもむしろ標的配列それ自体である。例えば、以下により詳しく説明するように、本発明の各ETMを含むヌクレオチド三リン酸を、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に際し、増殖する核酸に酵素的に加えることが可能である。当業者が認めるであろうように、いくつかの酵素は修飾したヌクレオチドに対し一般に寛容（tolerate）であることが示されているが、本発明の修飾ヌクレオチドの一部、例えば、「ヌクレオシド置換」の態様および恐らく一部リン酸エステルの付着は、増殖する核酸への取込みを可能とする酵素により認識されることもあり、されないこともある。したがって、この態様での好適な付着はヌクレオチドの塩基またはリボースに対するものである。

【0347】

このように、例えば、当業者周知のように、標的配列のPCR増幅は、その配列に一般にランダムに取込まれたETMを含む標的配列を与えることとなる。本発明のシステムは、図6Aおよび6Bに一般的に描出したように、これらのETMを用いて検出可能となるように構成することができる。

【0348】

別法として、より詳細に以下に説明するように、ETMを含むヌクレオチドを核酸の末端、例えば、標的核酸に酵素的に付加することが可能である。この態様においては、図6Qに一般的に描出したように、有効な「リクルートリンカー」を標的配列の末端に付加させ、それを検出に使用することができる。このように、本発明は、伝導性オリゴマーの単層と捕獲プローブを含む電極を利用する構成物、並びにアッセイ複合体の成分にハイブリダイズすることの可能な第1部分、およびアッセイ複合体の成分にハイブリダイズせず、少なくとも1つの共有結合により付着した電子伝達部分を含む第2部分とを含む標的配列を提供する。同様に、これらの組成物を利用する方法も提供する。

【0349】

プローブ配列、すなわち、相補性配列にハイブリダイズするように設計された配列(すなわち、メカニズム-1配列だが、これをメカニズム-2システムでも使用することができる)にETMを接続させることも可能である。このように、ETMは非リクルートリンカーにも同様に付加させることができる。例えば、アッセイ複合体の成分にハイブリダイズする標識プローブ断片、例えば、第1部分に、または上記および図6Rに記載の標的配列に付加したETMが存在してもよい。これらのETMは一部の態様において電子伝達検出に使用してもよく、あるいはその位置とシステムによっては使用することができない。例えば、ある態様において、例えば、図6Aおよび6Bに図示したように、無作為に取込ませたETMを含有する標的配列が捕獲プローブに直接ハイブリダイズする場合には、捕獲プローブにハイブリダイズする部分にETMが存在する。もし捕獲プローブが伝導性オリゴマーを用いる電極に付着するならば、これらのETMはすでに説明したように電子伝達を検出するのに使用することができる。あるいは、これらのETMは特異的に検出し得ない可能性もある。

【0350】

同様に、ある態様においては、リクルートリンカーが核酸である場合、リクルートリンカーの一部またはすべてが2本鎖であることが、ある例(例えばメカニズム-2システムなど)では望ましい。一態様においては、第2リクルートリンカーが存在し、それが実質的に第1リクルートリンカーに相補的であり、第1リクルートリンカーにハイブリダイズし得ることがある。好適な態様において、第1リクルートリンカーは共有結合により付着したETMを含む。別の態様において、第2リクルートリンカーはETMを含み、第1リクルートリンカーは含まず、ETMは第2リクルートリンカーが第1に対してハイブリダイズすることにより表面に集められる。さらにもう一つの態様においては、第1および第2リクルートリンカー双方がETMを含む。留意すべきことは、上記のように、大量数のETMを含む核酸は、同様にはハイブリダイズしない、すなわち、ETMの付着部位と特性に依存して T_m が低下することがある。かくして、一般に、多数のETMが鎖のハイブリダイズに用いられるとき、すなわちメカニズム-1システムでは、一般には約5より小さく、好ましくは約3より小さくする。あるいはETMは、介在するヌクレオチドが十分にハイブリダイズして良好な反応速度が可能となるように十分な空間距離をとるべきである。

【0351】

好適な態様において、本発明の構成物は、サンプル中の標的被検体を検出するために使用される。好ましい実施態様において、標的被検体は核酸であり、標的配列が検出される。本明細書において「標的配列」という用語または文法的等価物は1本鎖核酸上の核酸配列を意味する。標的配列は、遺伝子の部分、調節配列、ゲノムDNA、cDNA、mRNAとrRNAを含むRNA、その他であってよい。長さは任意であるが、配列が長い程より特異性が増すことは理解される。当業者が認めるであろうように、相補標的配列は多くの形状を取り得る。例えば、それはより大きな核酸配列内に、すなわち、とりわけ、遺伝子またはmRNAのすべてまたは部分、プラスミドまたはゲノムDNAの制限フラグメント内に含まれていてもよい。以下により詳細に概説するように、プローブは標的配列にハイブリダイズするように調製し、サンプル中標的配列の存在または不存在を測定

する。一般に、この用語は当業者が理解するところである。標的配列は異なる標的ドメインから構成されていてもよい；例えば、サンプル標的配列の第1標的ドメインは捕獲プローブまたは捕獲伸長プローブの一部にハイブリダイズしてもよく、第2標的ドメインは増幅プローブの一部、標識プローブ、または異なる捕獲もしくは捕獲伸長プローブなどにハイブリダイズしてもよい。標的ドメインは隣接していても、離れていてもよい。「第1」および「第2」という用語は標的配列の5' - 3' 方向に関して、配列の方向を付与することを意味するものではない。例えば、相補標的配列の5' - 3' 方向を仮定すると、第1標的ドメインは第2ドメインに対して5' に位置してもよく、あるいは第2ドメインに対して3' に位置してもよい。

【0352】

必要であれば、標的被検体は既知技法により調製する。例えば、既知の溶解バッファー、エレクトロポレーションなどによりサンプルを処理して細胞を溶解し、当業者には明らかなように、必要に応じ精製および/またはPCRなどで増幅させる。

【0353】

核酸システム用に、本発明のプローブは標的配列に相補性（下に説明するように、サンプルの標的配列または他のプローブ配列に対し）となるように設計し、標的配列と本発明プローブのハイブリダイゼーションが起こるようにする。下に概説するように、この相補性は完全である必要はない；標的配列と本発明の1本鎖核酸間のハイブリダイゼーションを阻害するような、相当数の塩基対ミスマッチがあってもよい。しかし、もし突然変異の数が多すぎて、ストリンジェンシーが最少のハイブリダイゼーション条件下でもハイブリダイゼーションが起こらないならば、その配列は相補的標的配列ではない。このように、本明細書において「実質的に相補的」とは、プローブが通常の反応条件下でハイブリダイズするために標的配列に十分に相補的であることを意味する。

【0354】

一般に、本発明の核酸組成物はオリゴヌクレオチドプローブとして有用である。当業者には明らかなように、プローブの長さは、標的配列の長さおよびハイブ

リダイゼーションと洗浄条件により変わる。一般に、オリゴヌクレオチドプローブは約8ないし約50ヌクレオチドの範囲であり、好ましくは約10ないし約30であり、特に好ましいのは約12ないし約25である。ある場合には、非常に長いプローブ、例えば、50ないし200～300ヌクレオチドの長さのものをを用いてもよい。このように、本明細書に描出した構造において、ヌクレオチドは核酸と置換え得る。

【0355】

多様なハイブリダイゼーション条件が本発明において使用し得るが、高度、中程度および低度のストリンジェンシー条件などである；例えば、Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, 1989, and *Short Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, et al. (出典明示により本明細書の一部とする) 参照。ストリンジェンシー条件は配列依存性であり、異なる環境では異なってくる。配列が長くなると、温度を上げて特異的にハイブリダイズさせる。核酸のハイブリダイゼーションの詳細にわたる説明がTijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)にある。一般に、ストリンジェンシー条件は、定めたイオン強度 pHにおける特異的配列の熱融点(T_m)より約5～10℃低い温度になるように選択する。 T_m は(定めたイオン強度、pHおよび核酸濃度で)、標的に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度である(T_m で標的配列が過剰量存在するとき、 T_m ではプローブの50%が平衡状態で占められる)。ストリンジェンシー条件は、pH 7.0ないし8.3で、塩濃度が約1.0ナトリウムイオン以下であり、典型的には約0.01ないし1.0 Mのナトリウムイオン濃度(または他の塩)であり、そして温度は、短プローブ用(例えば10ないし50ヌクレオチド)では少なくとも約30℃であり、長プローブ用(例えば50ヌクレオチド以上)では少なくとも約60℃であるような条件である。ストリンジェンシー条件は、ホルムアミドなどの非安定化剤の添加によっても実現できる。

【0356】

他の実施態様では、よりストリンジェンシーの低いハイブリダイゼーション条件を使用する；例えば、当業者に知られている、穏やかなまたは低度のストリンジェンシー条件を使用してもよい；Maniatis and Ausubel, 前出、および Tijssen, 前出、参照。

【0357】

ハイブリダイゼーション条件は技術上知られるように、非イオン性主鎖、すなわちPNAを用いても変わり得る。さらに、標的結合の後のハイブリダイゼーション複合体の2本鎖を架橋する、すなわち、共有結合により付着させるために、架橋剤を加えてもよい。

【0358】

当業者には明らかなように、本発明のシステムは、図3、4、5および6に一般的に描出したように、多数の異なる配置を取り得る。一般に、使用し得るシステムには3つのタイプがある：（1）標的配列それ自体がETMで標識されるシステム（図4A、5A、5Bおよび5D参照；一般的に核酸システムについて有用）；（2）標識プローブが直接標的配列に結合するシステム（核酸の実施例については図4Cおよび4H、そして非核酸被検体の実施例については図6A、6B、6Dおよび6E参照）；および（3）標識プローブが間接的に標的配列に、例えば、増幅プローブの使用を介して結合するシステム（核酸の実施例については図4C、5E、5Fおよび5G、そして非核酸標的被検体の代表例については図6C参照）。

【0359】

これら3つのシステムすべてにおいて、要求されるというわけではないが、電極表面に標的配列を固定するのが好ましい。これは捕獲結合リガンドと所望により1つまたはそれ以上の捕獲伸長プローブを用いて好適に実施される；核酸の代表的実施例については図3参照。捕獲プローブのみを利用する場合には、各標的配列に対しユニークな捕獲プローブをもつことが必要である；すなわち、表面はユニークな捕獲プローブを含むように設計しなければならない。あるいは、捕獲伸長プローブを使用することが可能であり、それが「普遍的」表面、すなわち、全ての標的配列を検出するのに使用し得る単一タイプの捕獲プローブを含む表面

を可能とする。「捕獲伸長」プローブは一般的に図4 C、5 C、5 E、5 Gおよび5 H、同様に図6 Bなどに描出され、捕獲プローブの全部または一部にハイブリダイズする第1部分と、標的配列の一部分にハイブリダイズする第2部分とをもつ。これが次いで設計された可溶性プローブの生成を可能にするが、当業者も認めるように、一般により簡単でコストも掛らない。本明細書に示すように、2つの捕獲伸長プローブを使用し得る。これは一般にアッセイ複合体を安定化するためになされる（例えば、標的配列が大きい場合、または大きな増幅プローブ（特に、分枝または樹枝状増幅プローブ）が使用される場合）。

【0360】

本明細書中の検討および図は、一般的に、核酸の実施態様を描出しているが、同じ思想を非核酸標的被検体についても使用することができる。例えば、当業者が必要とするときには、捕獲伸長リガンドを調製してもよい。例えば、図6 Bに一般的に図示したように、核酸「テール」を結合リガンドに加えてもよい。

【0361】

好適な態様において、結合リガンドは以下に検討するSAMの形成後に加えられる(上記(4))。これは、当業者が認識するように種々の方法で実施し得る。一態様において、末端官能基を有する伝導性オリゴマーは、活性化されたカルボン酸エステルとイソチオシアン酸エステルを利用する好適な態様により調製されるが、それは、活性化されたカルボン酸エステルを用いて、核酸などの結合リガンドに存在するかまたは取付けたかの一級アミンと反応する。これら二種類の試薬は水溶液中で安定であるという利点を持ち、さらに一級アルキルアミンと反応する。しかし、塩基のうち、一級芳香族アミンおよび二級および三級アミンは反応してはならず、そのようにして、核酸が表面に部位特異的に付加するようにしなければならない。同様の技法を非核酸成分に使用することができる；例えば、上に概略のとおり、タンパク質の、金属キレートを含むSAMへの付着は、公知である；米国特許第5,620,850号参照。これがその表面上に既知方法（インクジェット、スポッティングなど）によるプローブ（捕獲プローブまたは検出プローブのいずれか、または両方）のスポッティングを可能とする。

【0362】

さらに、核酸を表面上に固定化するために用い得る多くの非核酸方法がある。例えば、結合パートナー対が利用し得る；すなわち、一方の結合パートナーは伝導性オリゴマーの末端に付着させ、他方は核酸の末端に付着させる。これはまた核酸捕獲プローブを使用せずに実施し得る；すなわち、一方の結合パートナーは捕獲プローブとして作用し、他方は標的配列または捕獲伸長プローブのいずれかに付着する。すなわち、標的配列が結合パートナーを含むか、または標的配列にハイブリダイズする捕獲伸長プローブが結合パートナーを含むかのいずれかである。適切な結合パートナー対は、ビオチン/ストレプトアビジンなどのハプテン対、抗原/抗体、NTA/ヒスチジンタグなどであるが、これらに限定されるものではない。一般に、より小型の結合パートナーが好ましく、そのようにして電子は核酸から伝導性オリゴマー中へ移動し、検出を可能とする。

【0363】

好適な態様において、標的配列それ自体が修飾され結合パートナーを含む場合、結合パートナーは標的配列に酵素的に付着し得る修飾ヌクレオチドを介して、例えば、PCR標的増幅工程に際して付着する。あるいは、結合パートナーは標的配列に容易に付着する。

【0364】

あるいは、標的にハイブリダイズするための核酸部分および結合パートナーを有する捕獲伸長プローブを利用してもよい（例えば、捕獲伸長プローブは結合パートナーに付着するのに使用されるアルキルリンカーなどの非核酸部分を含んでもよい）。この態様においては、安定性のために標的の2本鎖核酸と捕獲伸長プローブとを、例えば、技術上既知のプロソラレンを用い架橋することが望ましい。

【0365】

一態様において、該標的は捕獲プローブを用いて電極表面に結合しない。この態様において重要なことは、本明細書のすべてのアッセイについて、過剰の標識プローブは検出前に除去すべきであり、アッセイ複合体（リクルートリンカー）は表面に接近させるべきことである。当業者が認識するように、これは他の方法で実施するのがよい。例えば、アッセイ複合体は、単層を含む電極に付加されるビーズ上に存在してもよい。ETMを含むリクルートリンカーは、表面上へのビ

ーズの重力沈降、ビーズ成分と表面間の静電氣的または磁氣的相互作用などの当技術分野で周知の技法を用い、上述の結合パートナー付着を用いて伝導性オリゴマー表面に近接して設置することができる。あるいは、過剰の標識プローブなどの過剰の試薬を除去した後、アッセイ複合体を、例えば、本明細書で概略する通り、電気泳動を介して、表面に送り込むことが可能である。

【0366】

しかし、好適な態様では、核酸捕獲プローブを介して付着したアッセイ複合体を利用する。

【0367】

好ましい実施態様として、標的配列自体がETMを含む。上記に検討したように、このことは相当数の位置に取込まれたETMをもつ標的配列により実施し得ることであり、上記概説のとおりである。この態様においては、このシステムのその他について、プローブと標的の3' - 5' 方向が、ETM含有構造（すなわち、リクルートリンカーまたは標的配列）が可能な限り単層の表面に接近するように、また、正しい方向となるように選択される。これは図面に一般的に示したように、絶縁体または伝導性オリゴマーを介する付着により実施することができる。さらに、当業者が認めるであろうように、複数の捕獲プローブは、捕獲プローブの5' - 3' 方向が異なる場合である図5Dに描出したような形状で、または複数の捕獲プローブを用いた場合に標的の「ループ」が生成する場所で利用することができる。

【0368】

好ましい実施態様として、図に一般的に描出したように、標識プローブが標的配列に直接ハイブリダイズする。これらの態様において、標的配列は、好ましくは、捕獲伸長プローブを含む捕獲プローブにより表面に固定するが、必ずしも必要ではない。次いで、標識プローブを用い、伝導性オリゴマーからなる単層の表面近傍にETMをもってくる。好適な態様においては、複数の標識プローブを用いる；すなわち、標識プローブを、標的配列にハイブリダイズする部分が多数の異なる標識プローブに応じて異なり得るように設計する。その結果、シグナルの増幅が起こるが、その理由は複数の標識プローブがそれぞれの標識配列に結合し

得るからである。このように、図に描出したように、 n は少なくとも1の整数である。所望の感度、標的配列の長さ、標識プローブ当たりのETM数により、 n の好適な範囲は1～50、特に好ましくは約1ないし約20、そしてとりわけ好ましいのは約2ないし約5である。さらに、もし「一般の」標識プローブが望ましいのであれば、増幅プローブの使用について一般的に下に説明したように、標識伸長プローブを用いることができる。

【0369】

上記のように、この態様においては一般に、システムの形状と標識プローブの配置は単層表面に可能な限り近接してETMが集まるように設計する。

【0370】

好適な態様において、標識プローブは間接的に標的配列にハイブリダイズさせる。すなわち、本発明はシグナル増幅技術と電極上での電子伝達検出との新規な組合わせに用途を見出すが、これは核酸の実施態様について図(以下参照)に一般的に描出したように、サンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにとりわけ有用である；同様のシステムを非核酸標的被検体について発展させることができる。これらの態様において、本発明の増幅プローブはサンプル中の標的配列に直接または間接的に結合する。増幅プローブは、好ましくは標識プローブの結合に利用し得る比較的多数の増幅配列を含むので、検出可能なシグナルが有意に増加し、標的の検出限界が有意に改善され得る。これらの標識と増幅プローブ、および本明細書に記載の検出方法は、本質的に既知の核酸ハイブリダイゼーションによるいずれかの方式、例えば、標的を直接固相に結合する方式で、または標的が1つ以上の核酸に結合し、それが次いで固相に結合するサンドイッチハイブリダイゼーションアッセイにて、使用可能である。

【0371】

一般に、これらの態様は、核酸を特に参照して以下のように説明し得る。増幅プローブは標的配列に直接(例えば、図4Cおよび5E)または標識伸長プローブの使用を介して(例えば、図5Fおよび5G)ハイブリダイズするが、これは「一般的な」増幅プローブの調製を可能とする。標的配列は、好ましくは捕獲プローブを使用して電極上に固定するが、必ずしも必要ではない。好ましくは、増

幅プローブは多様な増幅配列を含むが、ある態様においては、下記説明のように、増幅プローブは唯1つの増幅配列を含む。増幅プローブは多くの異なる形状をとることができる；例えば、分枝立体配座、樹枝状立体配座、または増幅配列の線状「ひも」などである。これらの増幅配列を使用して標識プローブとのハイブリダイゼーション複合体を形成し、電極を用いてETMを検出することができる。

【0372】

したがって、本発明は少なくとも1つの増幅プローブからなるアッセイ複合体を提供する。本明細書において「増幅プローブ」または「核酸多量体」または「増幅多量体」または文法的均等物とはシグナル増幅を容易にするために用いる核酸プローブを意味する。増幅プローブは以下に定義するように、少なくとも1つの1本鎖核酸プローブ配列、および少なくとも1つの1本鎖核酸増幅配列、好ましくは多様な増幅配列を含んでいる。

【0373】

増幅プローブは標識配列にハイブリダイズするために、直接または間接に使用する第1プローブ配列を含む。すなわち、増幅プローブ自体が標的配列に実質的に相補的である第1プローブ配列をもち得るか（例えば、図5E）、またはそれが追加のプローブの一部に実質的に相補的である第1プローブ配列をもち、その追加のプローブはの場合標識伸長プローブと呼ばれるものであって、標的配列に実質的に相補的である第1部分を有する（例えば、図5Fおよび5G）。好適な態様において、増幅プローブの第1プローブ配列は標的配列に実質的に相補的であり、それを図5Eに一般的に描出してある。

【0374】

一般に、本明細書のプローブすべてについて、第1プローブ配列は特異性と安定性を与えるに十分な長さのものである。このように一般に、もう一つの核酸にハイブリダイズするように設計された本発明のプローブ配列（すなわち、プローブ配列、増幅配列、より大きなプローブの部分またはドメイン）は少なくとも約5個のヌクレオシドの長さであり、好ましくは少なくとも約10個であり、そして特に好ましくは少なくとも約15個である。

【0375】

好適な態様において、増幅プローブまたは本発明の他のプローブのいずれかは、それらの標的の非存在下でヘアピンステムループ構造を形成することがある。ステムの2本鎖配列の長さは、ヘアピン構造が標的の存在下で有利にならないように選択する。本発明のシステムにおいて、またはいずれかの核酸検出システムにおいて、これらの型のプローブを使用すると非特異結合が有意に減少し、結果としてシグナルノイズ比が増大するに至る。

【0376】

一般に、これらのヘアピン構造は4つの成分を含む。その第1成分は標的結合配列、すなわち、標的に相補的な領域（サンプル標的配列であるか、または結合が要望どおりである他のプローブ配列であってもよい）であって、約10個のヌクレオチドの長さがあり、好ましくは約15個である。第2成分はループ配列であり、核酸ループの形成を容易にし得るものである。この観点で特に好ましいのはGTCの反復であり、脆弱X症候群において屈曲部を形成するものとして同定されている。（PNA類似体を使用する場合、屈曲部はプロリン残基を含むものが好ましい）。一般に、3ないし5つの反復が用いられるが、4ないし5が好ましい。第3の成分は自己相補性領域であり、これは標的配列領域の一部に相補的な第1部分と標識プローブ結合配列の第1部分を含む第2部分を有する。第4の成分は標識プローブ（または場合によっては他のプローブ）に実質的に相補的である。第4の成分はさらに「粘着末端」、すなわち、プローブの他の部分にハイブリダイズしない部分を含み、好ましくは、すべてではないが、ETMの殆どを含む。当業者が認めるであろうように、増幅、捕獲、捕獲伸長、標識、および標識伸長プローブを含めて、本明細書に記載したプローブのいずれかまたはすべてが、それらの標的の非存在下でヘアピンを形成するように配列することができる。

【0377】

好適な態様においては、数種の異なる増幅プローブを用いるが、そのそれぞれが標的配列の異なる部分にハイブリダイズする第1プローブ配列をもつ。すなわち、1以上の増幅レベルがある；増幅プローブは多数の標識事象によりシグナルを増幅し、また、それぞれ多様な標識をもつ数種の異なる増幅プローブが各標的

配列に対して使用される。このように、好適な態様では少なくとも2種類の異なる増幅プローブのプールを利用するが、それぞれのプールは標的配列の異なる部分に対しハイブリダイズするための異なるプローブ配列をもつ；異なる増幅プローブの数に関して唯一実際の制限は、当初標的配列の長さであろう。さらに、一般に好ましいことではないが、異なる増幅プローブが異なる増幅配列を含むことも可能である。

【0378】

好適な態様において、増幅プローブはサンプルの標的配列と直接ハイブリダイズしないが、代りに、図5Fに一般的に描出したように、標識伸長プローブの第1部分にハイブリダイズする。これは「一般的な」増幅プローブ、すなわち、様々な異なる標的と共に使用し得る増幅プローブの使用を可能とするためにとりわけ有用である。これは増幅プローブのいくつかが特別の合成技術を必要とするという理由で望ましいことである。このように、標識伸長プローブとして比較的短いプローブを加えることが好ましい。このように、増幅プローブの第1プローブ配列は、第1標識伸長1本鎖核酸プローブの第1部分またはドメインに実質的に相補性である。標識伸長プローブはまた、標識配列の一部に実質的に相補性である第2部分またはドメインをも含む。これらの部分双方が、好ましくは少なくとも約10ないし約50ヌクレオシドの長さであり、好ましくは約15ないし約30の範囲である。「第1」および「第2」という用語は標的またはプローブ配列の5' - 3' 方向に関して、配列の方向を付与することを意味するものではない。例えば、相補標的配列の5' - 3' 方向を仮定すると、第1部分は第2部分に対して5' に位置してもよく、あるいは第2部分に対して3' に位置してもよい。本明細書では便宜上、プローブ配列の順序を一般に左から右に示すこととする。

【0379】

好適な態様において、1つ以上の標識伸長プローブ増幅プローブ対が使用される、すなわち、 n は1以上である。すなわち、複数の標識伸長プローブを用い、その各々が標的配列の異なる部分に実質的に相補性である部分をもつ；これはもう一つの増幅レベルとして役立ち得る。このように、好適な態様では少なくとも

2つの標識伸長プローブのプールを利用するが、その上限は標的配列の長さにより決まる。

【0380】

好適な態様においては、図5Gに描出し、また米国特許第5,681,697号（出典明示により本明細書の一部とする）に一般的に概説されているように、1つ以上の標識伸長プローブを単一の増幅プローブと共に用い、非特異結合を減少させる。この態様において、第1標識伸長プローブの第1部分は標的配列の第1部分にハイブリダイズし、第1標識伸長プローブの第2部分は増幅プローブの第1プローブ配列にハイブリダイズする。第2標識伸長プローブの第1部分は標的配列の第2部分にハイブリダイズし、第2標識伸長プローブの第2部分は増幅プローブの第2プローブ配列にハイブリダイズする。これらの形状構造は、ある場合に「十字型」構造または形状といい、一般に、大型の分枝または樹枝状増幅プローブを用いる場合には、安定性を付与するために実施される。

【0381】

さらに、当業者が認めるであろうように、標識伸長プローブは下記のように、直接増幅プローブとよりもむしろプレ増幅プローブと相互作用する可能性がある。

【0382】

同様に、上記に概説したように、好適な態様では数種の異なる増幅プローブを利用するが、それぞれが標識伸長プローブの異なる部分にハイブリダイズする第1プローブ配列をもつ。さらに、上に概説したように、これは一般に好ましいことではないが、異なる増幅プローブが異なる増幅配列を含むことも可能である。

【0383】

第1プローブ配列に加えて、増幅プローブはまた、少なくとも1つの増幅配列を含んでいる。本明細書において「増幅配列」または「増幅セグメント」または文法的均等物とは、下記により詳しく説明するように、標識プローブの第1部分に結合させるために、直接または間接に使用する配列を意味する。好ましくは、増幅プローブは多様な増幅配列を含んでおり、好ましくは約3ないし約1000からなり、特に好ましくは約10ないし約100からなり、そしてとりわけ好ま

しいのは約50である。ある場合には、例えば、線状の増幅プローブを使用する場合、1ないし約20が好ましく、特に、約5ないし約10が好ましい。

【0384】

増幅配列は当業者が認めるであろうように、様々な様式で互いに結合することができる。これらは互いに共有結合により直接結合するか、またはリン酸ジエステル結合、PNA結合などの核酸結合を介して、またはアミノ酸、炭水化物またはポリオールブリッジなどの挿入結合剤を介して、または他の架橋剤または結合パートナーを介して、介在配列もしくは化学的部分に結合してもよい。結合部位はセグメントの末端であっても、および／または1つ以上の鎖内の内部ヌクレオチドであってもよい。好適な態様において、増幅配列は核酸結合を介して付着する。

【0385】

好適な態様においては、米国特許第5,124,246号(出典明示により本明細書の一部とする)に一般的に説明されているように、分枝状の増幅配列を使用する。分枝状の増幅配列は「フォーク様」または「櫛様」の立体配座を採ることが可能である。「フォーク様」分枝状増幅配列は一般に分枝状構造を形成する起点から発生する3つ以上のオリゴヌクレオチドセグメントをもつ。起点とは、少なくとも3つのセグメントが共有結合によりまたは堅固に結合し得るもう一つのヌクレオチドセグメントまたは多機能分子である。「櫛様」分枝状増幅配列とは、線状の背骨をもち、その背骨から多数の側鎖オリゴヌクレオチドが伸び出しているものである。いずれの立体配座においても、張り出したセグメントは、通常、修飾したヌクレオチドに、またはオリゴヌクレオチド付着用の適切な官能基をもつ他の有機部分に左右される。さらに、いずれの立体配座においても、多数の増幅配列が、検出プローブに直接もしくは間接に結合させるために利用し得る。一般に、これらの構造は修飾した多機能ヌクレオチドを用い、とりわけ米国特許第5,635,352号および第5,124,246号に記載されているように、技術上既知として調製される。

【0386】

好適な態様において、樹枝状増幅プローブは、米国特許第5,175,270(

出典明示により本明細書の一部とする)に記載されているように使用する。樹枝状増幅プローブはハイブリダイゼーションを介して付着する増幅配列をもち、その結果、それらの構造の成分として2本鎖核酸の部分をもつ。樹枝状増幅プローブの外表面は多様な増幅配列をもつ。

【0387】

好適な態様においては、線状の増幅プローブを用いるが、これは個々の増幅配列が末端-末端で直接結合するか、または短い介在配列と結合してポリマーを形成する配列をもつ。他の増幅形状のように、増幅配列間に追加の配列または部分があってもよい。さらに、本明細書に概説するように、線状の増幅プローブは図12に描出したように、ヘアピンステムループ構造を形成してもよい。

【0388】

一態様において、線状の増幅プローブは単一の増幅配列をもつ。これは、ハイブリダイゼーション/解離のサイクルが起こり、標的にハイブリダイズしていた増幅プローブが次いで除去されて、さらにプローブが結合できるようにする増幅プローブのプールを形成している場合、または大量のETMを各プローブに対し使用する場合に有用である。しかし、好適な態様においては、線状の増幅プローブは多様な増幅配列を含む。

【0389】

さらに、増幅プローブは全体が線状であるか、全体が分枝であるか、全体が樹枝状であるか、またはその組合わせであってもよい。

【0390】

増幅プローブの増幅配列を直接または間接に用い、検出を可能とする標識プローブに結合させる。好適な態様において、増幅プローブの増幅配列は標識プローブの第1部分に実質的に相補的である。あるいは、増幅伸長プローブを用いるが、これは増幅配列に結合する第1部分と、標識プローブの第1部分に結合する第2部分をもつ。

【0391】

さらに、本発明の組成物は「プレ増幅」分子を含んでもよいが、これは標識伸長分子と増幅プローブ間の架橋部分としての役割をもつ。この方法で、さらに多

くの増幅因子と、したがて、さらに多くのETMが最終的に検出プローブに結合される。プレ増幅分子は線状であっても分枝状であってもよく、典型的には約3000～30000個の範囲でヌクレオチドを含む。

【0392】

以下に概括する反応は、当業者が認めるであろうように様々な方法で実施することができる。反応成分は同時に加えてもよいし、何らかの順序で順番に加えてもよいが、好適な態様は以下に概括するとおりである。さらに、この反応はアッセイに含まれ得る種々の他の試薬を含んでもよい。これらは塩、バッファー、中性タンパク質、例えば、アルブミン、洗剤などの試薬類を含み、最適なハイブリダイゼーションと検出を容易にし、および／または非特異もしくはバックグラウンド相互作用を減少させるために使用することができる。他の条件でアッセイ効率を改善する試薬として、例えば、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗微生物剤などを、サンプル調製方法および標的の純度に応じて使用してもよい。

【0393】

一般的に、本方法は以下のとおりである。好適な態様において、標的を最初に、上記方法の一つを用いて検出プローブの近傍に移動させる。一般に、2つの方法が採用し得る；ハイブリダイゼーション促進剤を含む下記のごときアッセイ複合体がまず形成され（すなわち、すべての可溶性成分、例えば、捕獲伸長プローブ、標識プローブ、増幅プローブ、標識伸長プローブなどが共に、同時にまたは連続的に添加される）、次いで、該複合体は検出電極に結合するための表面に加えられる。あるいは、標的を添加し、ハイブリダイゼーションを促進させ、捕獲結合リガンドに標的が結合することを可能とし、次いで追加の成分を加えてアッセイ複合体を形成する。後者については下記に詳細に記載するが、双方の手法は以下のとおりである。同様に、一部の成分を加え、電気泳動し、次に他の成分を加える；例えば、標的被検体はいずれかの捕獲伸長プローブと組合わせ、次いで輸送するなどである。さらに、本明細書に概説するように、電気泳動工程は「洗浄」工程実施のために使用してもよく、その場合に過剰の試薬（未結合被検体、過剰のプローブなど）を表面から排除し得る。

【0394】

好適な態様において、非特異的相互作用はいくつかの電気泳動法を用いて減少させることができる。好適な態様において、標的配列に直接または間接的に特異結合しない標識プローブは逆の電界パルスにより表面から除去することができる、すなわち、電界をある時間の間逆転させる。逆電界強度は特異的に結合した標識プローブを（または付着とアッセイ複合体の他の必要な成分のいずれをも）排除しないように選択する。

【0395】

好適な態様において、例えば、電気泳動を使用する場合、ETMを含む標識プローブまたは標識結合リガンドは標的被検体と逆の電荷をもつ。これは核酸標識プローブまたは帯電溶液結合リガンドにより実施し得るが、議論は核酸の態様に焦点をしばる。これは2つの異なるシステムにおいて有用である。好適な態様において、標的被検体は大過剰の電荷を担持している、すなわち、核酸の場合における負電荷である。1つ以上の陽性帯電標識プローブの結合が標的複合体上の正味の負電荷を有意に変えることはない；すなわち、標的はなお陰極に引き付けられている。しかし、非結合標識プローブ、または標的に特異的に結合していない標識プローブは反発され、その結果、非特異結合の減少に至る。例えば、PNA主鎖は正味の正電荷をもつように修飾し得るし、正に帯電する技術上既知の他の核酸類似体が存在する。

【0396】

好適な態様において、標識プローブは大量の逆電荷をもち、その結果、標的被検体へ結合すると、標的被検体の正味の電荷が変化する。このように、例えば、核酸では、標識プローブが標識プローブ-標的被検体複合体を陽性に帯電させるに十分な正電荷を担持する。これは結果として特異標的被検体を陽極に引き付けることになるが、他の陰性に帯電した要素、すなわち、他の核酸は撃退される。これは特に過剰の他の標的が存在する場合に有用である；例えば、標的被検体が大過剰の他の核酸中の少数種である場合がその例である。

【0397】

好適な態様において、標的被検体は最初に電気泳動により検出電極に輸送され、次いで、検出電極に固定または付着する。一態様において、これは捕獲プロー

ブと標的被検体の一部との間に付着複合体（核酸成分を使用する場合、本明細書では多くの場合ハイブリダイゼーション複合体という）を形成することにより実施される。好適な態様では捕獲伸長結合リガンド（本明細書では捕獲伸長プローブとも呼ぶ）を利用する；この態様において、付着複合体は標的配列の一部と捕獲伸長プローブの第1部分との間に形成され、さらなる付着複合体が捕獲伸長プローブの第2部分と捕獲プローブの一部との間に形成される。さらに好適な態様ではさらなる捕獲プローブを利用し、標的配列の一部と第2捕獲伸長プローブの第1部分との間に付着複合体を形成し、第2捕獲伸長プローブの第2部分と捕獲プローブの第2部分との間に付着複合体を形成する。

【0398】

別法として、電極に対する標的配列の付着は他の反応と同時に実施する。

【0399】

この方法は、もし利用するのであれば、増幅プローブの導入で始める。好適な態様においては、増幅プローブは標的配列の一部分に実質的に相補的な第1プローブ配列と、少なくとも1つの増幅配列を含む。

【0400】

一態様において、増幅プローブの第1プローブ配列は標的配列にハイブリダイズし、ハイブリダイズしていない増幅プローブは除かれる。これは技術上既知のとおり実施されるが、アッセイのタイプに依存する。標的配列が電極などの表面に固定化されると、過剰の試薬の除去は一般に、当業者が認めるであろうように、1回以上の洗浄工程により実施される。この態様において、標的は固形支持体上に固定される可能性がある。標的配列が表面に固定されない場合、本発明プローブなど、過剰の試薬の除去は、該プローブに相補的な配列を含むビーズ（すなわち、固形の支持体粒子）を添加することにより実施することができるが、その場合、過剰のプローブはビーズに結合する。次いで、ビーズは、例えば、遠心分離、濾過、磁場または静電場の適用などにより除去し得る。

【0401】

次いで、反応混合物は、増幅プローブが標的配列から解離する条件（温度、高濃度塩、pH変化など）に付し、増幅プローブを取得する。次いで、増幅プローブ

ブは増幅プローブ用の捕獲プローブからなる電極に加え、標識プローブを添加し、次いで検出を実施する。

【0402】

好適な態様においては、標的配列にさらに増幅プローブを添加することにより、より大きなプローブ・プールが生成し、ハイブリダイゼーション／解離反応が繰返され、増幅プローブのより大きなプールを生成する。この増幅プローブのプールは、次いで、増幅捕獲プローブからなる電極に添加し、標識プローブを添加し、次いで検出を始める。

【0403】

この態様においては、本明細書に記載の方法を用い、電極を含む固形支持体上に標的配列を固定化するのが好ましい；当業者が認めるところであるが、代りの固形支持体付着技術、例えば、ガラス、ポリマーなどへの付着技術を用いてもよい。1つの固形支持体上で反応を行い、次いでプールした増幅プローブを検出用の電極に加えることも可能である。

【0404】

好適な態様において、増幅プローブは多様な増幅配列を含む。

【0405】

一態様において、増幅プローブの第1プローブ配列は標的配列にハイブリダイズし、ハイブリダイズしていない増幅プローブを除去する。再度、好適な態様では固定化した標的配列を利用するが、ここでは電極に付着した捕獲プローブとのハイブリダイゼーションにより固定化するか、または捕獲伸長プローブにハイブリダイズし、それを次いで本明細書に記載のように固定化した捕獲プローブとハイブリダイズさせることにより固定化する。一般に、これらの態様においては、捕獲プローブと検出プローブを電極上、一般には同一の「アドレス」に固定する。

【0406】

好適な態様において、増幅プローブの第1プローブ配列は少なくとも一つの標識伸長プローブの第1部分にハイブリダイズし、標識伸長プローブの第2部分は標的配列の一部にハイブリダイズする。他の好適な態様では、図5Gに一般的

に図示したとおり、1を超える標識伸長プローブを利用する。

【0407】

好適な態様において、増幅プローブの増幅配列は、少なくとも1つの標識プローブ配列にハイブリダイズさせることにより、直接検出に使用する。

【0408】

本発明はこのように標的配列と標識プローブを最小限に含んでいるアッセイ複合体を提供する。本明細書で「アッセイ複合体」とは、被検体を含む付着またはハイブリダイゼーション複合体の集合体を意味し、検出を可能とする結合リガンドおよび標的を含む。アッセイ複合体の組成物は本明細書に概説した異なるプローブ成分の用途に依存するものである。このように、図6Aにおいて、アッセイ複合体は捕獲プローブと標的配列を含む。アッセイ複合体はまた、捕獲伸長プローブ、標識伸長プローブ、および増幅プローブを包含するが、本明細書に概説するように、使用する形状に依る。

【0409】

このアッセイは、標的の存在下にのみ標識プローブ付着複合体の形成を可能とするストリンジェンシー条件下に一般に実施する。ストリンジェンシーは熱力学的変数である工程パラメーターを変えることにより制御し得る。パラメーターは温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度pH、有機溶媒濃度などであるが、これらに限定されるものではない。ストリンジェンシーに電気泳動工程の使用を含めて、非特異的（すなわちストリンジェンシーが低い）物質を検出電極から離れさせてもよい。

【0410】

これらのパラメーターは、米国特許第5,681,697号に一般的に概説されているように、核酸における非特異結合を制御するためにも使用することができる。このように、一定の工程はストリンジェンシーが高い条件で実施するのが望ましい；例えば、最初のハイブリダイゼーション工程が標的配列と標識伸長と捕獲伸長プローブの間で実施される場合である。特定の結合を優先させる条件でこの工程を実施すると、非特異結合を減少させることができる。

【0411】

好適な核酸態様において、本明細書に概括した成分のすべてを使用する場合、好適な方法は以下のとおりである。1本鎖標的配列をハイブリダイゼーション条件下で捕獲伸長プローブおよび標識伸長プローブとインキュベートする。好適な態様ではこの反応を固定化した捕獲プローブを有する電極の存在下で行うが、この反応は最初のインキュベーションと引続く電極への付加による2工程で実施してもよい。過剰の試薬は洗浄除去し、次いで増幅プローブを添加する。もしプレ増幅プローブを用いるならば、それらは増幅プローブの前に、または増幅プローブと同時に加えてもよい。過剰の試薬は洗浄除去し、次いで標識プローブを添加する。過剰の試薬は洗浄除去し、下に概説するように検出を始める。

【0412】

一態様においては、標的配列の異なる部分にそれぞれ実質的に相補性である多くの捕獲プローブ（または捕獲プローブと捕獲伸長プローブ）が使用される。

【0413】

再度、本明細書に概説するように、増幅プローブを用いる場合、このシステムは、一般に、標識プローブ結合に際し、ETMを含むリクルートリンカーが、伝導性オリゴマー（メカニズム-2）を含む単層表面の近接位にまたは検出プローブの近接位に位置するように配置される。このように、例えば、メカニズム-2システムについては、本明細書に概説するように、ETMが「樹枝状」型構造を介して付着する場合、核酸の付着点からETMまでのリンカーの長さは、特に、捕獲伸長プローブを用いる場合に捕獲プローブの長さと共に変わり得る。すなわち、より長い捕獲プローブは、捕獲伸長をもち、より短い捕獲プローブにおいてよりも、表面からさらに離れて「保持」された標的配列となる。プローブ核酸とETMの間に余分の連結配列を加えると、ETMが表面に空間的に近接することとなり、より良好な結果を与える。同様に、メカニズム-1システムについて、リクルートリンカーの長さ、検出プローブの長さ、およびそれらの距離を最適化することができる。

【0414】

さらに、所望により、本発明に利用される核酸は検出に先立ち、もし適用可能であれば、リガーゼの使用などの標準的分子生物学技法を用いることにより結合

させることもできる。同様に、安定性を望むのであれば、架橋剤を加え、構造を安定させることが可能である。

【0415】

当業者に認められるように、核酸について記載しているが、本明細書で概説したシステムは、他の標的非検体について同様に使用することができる。

【0416】

本発明の構成物は、一般に、下記およびU. S. S. N. 08/743, 798, 08/873, 978, 08/911, 085, 08/911, 085、およびPCT US97/20014(これらすべては出典明示により本明細書の一部とする)に概説のように、一般に当分野で既知の方法を使用して合成する。当業者に認められるように、下記に概説の多くの方法は、リボスーリン酸主鎖を含む核酸に関する。しかしながら、上記に概説のように、多くの別の核酸類似体を使用し得、そのいくつかは主鎖にリボスまたはリン酸を含まない。これらの実施態様において、塩基以外の位置での結合に関して、結合は、主鎖に依存して、当業者に認められるように行う。従って、例えば、結合はPNA主鎖の炭素原子で、下記に記載のように、またはPNAのいずれかの末端で行うことができる。

【0417】

本構成物はいくつかの方法で製造し得る。好ましい方法は最初にヌクレオシドに結合した伝導性オリゴマーを、更にヌクレオシドを添加して捕獲プローブを形成し、続いて電極へ結合させて、合成する。あるいは、全捕獲プローブを製造し、次いで、完全な伝導性オリゴマーを添加し、続いて電極に結合する。あるいは、伝導性オリゴマーの単層(そのいくつかは、捕獲プローブの結合のための官能基を有する)を最初に電極に結合し、続いて捕獲プローブを結合する。後者の二つの方法は、使用する伝導性オリゴマーが、溶媒中でおおよび慣用的核酸合成の条件下で安定でないとき、好ましいことがある。

【0418】

好ましい実施態様において、本発明の構成物は、最初に、ヌクレオシドに共有結合した伝導性オリゴマーを形成し、続いて、さらにヌクレオシドを添加して捕

獲プローブ核酸を形成し、伝導性オリゴマーを電極へ添加することを含む最後の工程により製造される。

【0419】

伝導性オリゴマーのヌクレオシドへの結合はいくつかの方法で行い得る。好ましい実施態様において、全てまたは一部の伝導性オリゴマーを、最初に合成し(一般に、電極への結合のために官能基を末端に有する)、これを次いでヌクレオシドに結合させる。次いで、さらにヌクレオシドを必要に応じて添加し、最後の工程で一般に電極へ結合させる。あるいは、オリゴマー単位を一度にヌクレオシドに添加し、さらにヌクレオシドを添加し電極へ結合させる。多くの代表的な合成をWO98/20162、PCT/US98/12430、PCT/US98/12082、PCT/US99/01705、PCT/US99/01703 およびU.S.S.N. 09/135, 183, 60/105, 875、および09/295, 691の図面に示し、これら全ては出典明示により本明細書の一部とする。

【0420】

次いで、伝導性オリゴマーを、本明細書に記載のように結合した、1個(またはそれ以上の)オリゴマー単位を含み得るヌクレオシドに結合させる。

【0421】

好ましい実施態様において、結合は、アミドおよびアミン結合を含む、リボース-リン酸主鎖のリボースに対してである。好ましい実施態様において、リボースに結合した窒素と伝導性オリゴマーの芳香族環の間に、少なくとも一つのメチレン基または他の短い脂肪族アルキル基(Z基として)が存在する。

【0422】

あるいは、PCT US97/20014で一般的に概説のとおり、結合はリボース-リン酸主鎖のリン酸を介する。

【0423】

好ましい実施態様において、結合は塩基を介する。好ましい実施態様において、保護基を、当業者に一般的に知られているように、伝導性オリゴマーの付加の前に塩基に添加してもよい。加えて、パラジウム交差結合反応を変えて、二量体

化問題を防止することもできる；すなわち、二つの伝導性オリゴマーが、塩基に結合せず、むしろ二量体化する。

【0424】

あるいは、塩基への結合を、一単位のオリゴマーを有するヌクレオシドを製造し、続いて他を添加することによりなし得る。

【0425】

修飾ヌクレオシドを製造し、保護して活性化したら、電極への結合の前に、標準的な合成技法 (Gait, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, UK 1984; Eckstein) により、伸長しているオリゴヌクレオチドに、幾通りかの方法でそれらを包含させ得る。

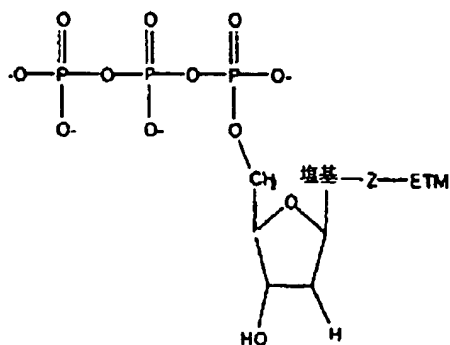
【0426】

一実施態様において、1またはそれ以上の修飾ヌクレオシドを三リン酸形態に変形させ、成長しているオリゴヌクレオチド鎖に、酵素DNAポリメラーゼI、T4DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、逆転写酵素およびRNAポリメラーゼを用いるなど、標準的な分子生物学技法を用いて包含させる。3'修飾ヌクレオシドの核酸への包含には、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用し得る。(Ratliff, *Terminal deoxynucleotidyltransferase*. In *The Enzymes*, Vol. 14A. P. D. Boyer ed. pp 105-118. Academic Press, San Diego, CA 1981)。従って、本発明は、共有結合したETMを含むデオキシリボヌクレオシド三リン酸を提供する。好ましい実施態様は、一般に下記構造42および43に示すように、塩基またはリボース（好ましくは2'位で）などの主鎖へのETM結合を利用する。

【0427】

【化42】

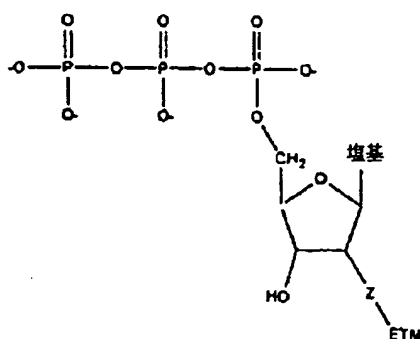
構造 4 2



【0428】

【化43】

構造 4 3



【0429】

従って、いくつかの実施態様において、ETMを含む核酸をその場で産生させることができる。例えば、標的配列の末端が露出する、すなわちハイブリダイズしないように、標的配列は捕獲プローブ(例えば、表面上の)にハイブリダイズし得る。酵素とETMで標識した三リン酸ヌクレオチドの添加により、その場での標識の製造が可能となる。同様にポリメラーゼにより認識される標識ヌクレオチドを用いると、PCRと検出とを同時に行い得る；つまりその場で標的配列が生成する。

【0430】

好ましい実施態様において、修飾ヌクレオシドをホスホルアミダイトまたはH

ーホスホネート形に変換し、これを次いでオリゴヌクレオチド合成の固相または溶液合成に使用する。この方法で、リボースでの(すなわち、アミノーまたはチオール修飾ヌクレオシド)または塩基での結合用の、修飾ヌクレオチドをオリゴヌクレオチドに内部位置または5'末端で包含させる。これは、一般に、二つの方法の一つで行う。第1に、リボースの5'位を4', 4-ジメトキシトリチル(DMT)で保護し、続いて2'-シアノエトキシ-ビス-ジイソプロピルアミノホスフィンとジイソプロピルアンモニウムテトラゾリド存在下で反応させるか、または2'-シアノエトキシホスフィнокロロジイソプロピルアミノと反応させ、当分野で既知のようにホスホルアミダイトを得る;しかしながら、他の方法を当業者に認められるように使用し得る。Gail 前出; Caruthers, Science 230: 281 (1985) 参照、両方とも出典明示により本明細書の一部とする。

【0431】

基の3'末端への結合のために、好ましい方法は制御孔ガラス(CPG)または他のオリゴマー支持体への修飾ヌクレオシド(またはヌクレオシド代替物)の結合を使用する。この実施態様において、修飾ヌクレオシドを5'末端でDMTで保護し、次いで、無水コハク酸と活性化しながら反応させる。得られるスクシニル化合物をCPGまたは当分野で既知の他のオリゴマー支持体に結合させる。更に、修飾しているか、またはしていないホスホルアミダイトヌクレオシドを、脱保護後に5'末端に結合させる。従って、本発明はCPGのような固体オリゴマー支持体に結合したヌクレオシドに共有結合した伝導性オリゴマーまたは絶縁体、および本発明のヌクレオシドのホスホルアミダイト誘導体を提供する。

【0432】

本発明はさらにETMを含むリクルートリンカーを有する標識プローブの製造方法を提供する。当業者には明らかなように、これらの合成反応はリクルートリンカーの特徴とETMの結合方法に依存する。核酸リクルートリンカーについて、標識プローブは、本明細書で概説したように、1以上の位置でETMを包含させて一般につくられる。遷移金属錯体をETMとして使用する場合、合成はいくつかの方法で行われる。好ましい実施態様において、配位子、続いて遷移金属イオンをヌクレオシドに添加し、次いで、遷移金属錯体が結合しているヌクレオシ

ドをオリゴヌクレオチドに添加する、つまり、核酸合成機に添加する。あるいは、配位子を結合させ、続いて成長しているオリゴヌクレオチド鎖に包含させ、金属イオンを添加する。

【0433】

好ましい実施態様において、ETMをリボース-リン酸主鎖のリボースに結合させる。これは、伝導性オリゴマーについて本明細書に概説したように通常行われ、本明細書およびPCT公開WO95/15971に記載のように、アミノ修飾またはオキソ修飾ヌクレオシドを使用して、リボースの2'または3'位に行う。次いで、配位子として、例えば金属イオンの結合のための遷移金属配位子として、または、例えばアミド結合を介した、他の配位子または有機ETMの結合に使用できる化学的官能基として、当分野で認められるように、アミノ基を使用し得る。例えば、例として、リボースを介して結合した種々のETMを有するヌクレオシドの合成を記載する。

【0434】

好ましい実施態様において、ETMはリボース-リン酸主鎖のリン酸に結合する。本明細書に概説のように、これは、ホスホルアミダイト結合のようなホスホジエステル類似体を使用して行われてもよく（一般に、PCT公開WO95/15971参照）、またはPCT US97/20014に記載のものと同様の方法を使用し、但し、伝導性オリゴマーを遷移金属配位子または錯体または有機ETMと置きかえて行なうこともできる。

【0435】

別の主鎖、例えば、ペプチド核酸または別のリン酸結合への結合は、当業者に認められるように行う。

【0436】

好ましい実施態様において、ETMはヌクレオシドの塩基に結合する。これは、種々の方法でなし得る。一実施態様において、天然に存在するか、または本明細書に記載のように添加した（例えば、図参照）塩基のアミノ基を、遷移金属錯体の配位子として、または例えば、アミド結合を介して他の配位子をまたは有機ETMを添加するのに使用できる化学的官能基として使用する。これは、当業者に認

められるように行う。あるいは、複素環式環に結合したハロゲン原子を含むヌクレオシドは商品として入手可能である。アセチレン結合配位子は、一般的に既知のように、ハロゲン化塩基を使用して添加し得る；例えば、Tzalis et al., Tetrahedron Lett. 36(34): 6017-6020 (1995); Tzalis et al., Tetrahedron Lett. 36(2): 3489-3490 (1995); およびTzalis et al., Chem. Communications (投稿中) 1996参照、全て出典明示により本明細書の一部とする。また、塩基へのアセチレン結合を介して結合したメタロセン（この場合では、フェロセン）の合成を記載した図面および実施例も参照。

【0437】

ある実施態様において、ヌクレオシドを遷移金属配位子で製造し、核酸に包含させ、次いで、遷移金属イオンおよび残りの必要な配位子を当分野で既知のように添加する。別の実施態様において、遷移金属イオンおよび付加的配位子を、核酸への包含前に添加する。

【0438】

一旦、本発明の核酸を、共有結合により付着した付着リンカー（つまり、絶縁体または伝導性オリゴマーのいずれか）を含めて製造したら、付着リンカーを電極に付着させる。本方法は、使用する電極のタイプによって変化する。本明細書に記載のように、結合リンカーは一般に末端「A」リンカーと共に製造され、電極への付着を促進する。本適用の目的のために、硫黄-金結合は共有結合とみなす。

【0439】

好ましい実施態様において、伝導性オリゴマー、絶縁体および付着リンカーは硫黄結合を介して電極に共有結合する。しかしながら、驚くべきことに、分子の金電極への結合に使用する慣用的保護基は、一般に、本明細書に記載の組成物の合成およびオリゴヌクレオチド合成反応への包含の両方への使用に理想的でない。従って、本発明は、図に記載のようなエチルピリジンおよびトリメチルシリルエチルを含む、普通でない保護基を利用する、伝導性オリゴマーの金電極への結合の新規方法を提供する。しかしながら、当業者が理解するように、伝導性オリゴマーが核酸を含まないとき、アセチル基などの慣用的保護基を使用し得る。参

照、Greene et al., 前出。

【0440】

これは、いくつかの方法でなし得る。好ましい実施態様において、電極への付着のために硫黄原子を含む伝導性オリゴマーのサブユニットをエチルピリジンまたはトリメチルシリルエチル基で保護する。前者に関して、これは一般に硫黄原子(好ましくはスルフヒドリルの形で)を含むサブユニットをビニルピリジン基またはビニルトリメチルシリルエチル基と、エチルピリジン基またはトリメチルシリルエチル基が硫黄原子に添加されるような条件下で接触させることにより行う。

【0441】

このサブユニットはまた、一般に、付加的サブユニットの付着のために官能部を含み、かくして、付加的サブユニットが付着して伝導性オリゴマーを形成する。次いで、伝導性オリゴマーをヌクレオシドに付着させ、付加的ヌクレオシドが結合する。保護基を次いで除去し、硫黄-金共有結合を行う。あるいは、伝導性オリゴマーの全てまたは一部を製造し、次いで、保護硫黄原子を含むサブユニットを添加するか、硫黄原子を添加して、保護する。伝導性オリゴマーを次いでヌクレオシドに付着させ、付加的ヌクレオチドを付着させる。あるいは、核酸に付着した伝導性オリゴマーを製造し、次いで保護硫黄原子を含むサブユニットを添加するか、硫黄原子を添加して、保護する。あるいは、エチルピリジン保護基を上記のように使用してもよいが、1以上の工程の後に除去し、ジスルフィドのような標準的な保護基に置き換える。このように、エチルピリジンまたはトリメチルシリルエチル基は、合成反応のいくつかで保護基として作用し得、次いで、除去して慣用的保護基に置き換えられる。

【0442】

本明細書の伝導性ポリマーの「サブユニット」は、硫黄原子が結合する伝導性オリゴマーの少なくとも一部を意味するが、伝導性オリゴマーの付加的成分の添加を可能にする官能基、または伝導性オリゴマーの付加的成分を含む付加的原子も存在し得る。従って、例えば、構造1のオリゴマーを使用するとき、サブユニットは少なくとも第1のY基を含む。

【0443】

好ましい方法は、1)一般に、ビニルピリジンまたはトリメチルシリルエチル基をスルフヒドリルに添加して行う、伝導性オリゴマーの第1サブユニットに結合した硫黄原子への、エチルピリジンまたはトリメチルシリルエチル保護基の添加；2)伝導性オリゴマーの形成のための付加的サブユニットの添加；3)少なくとも第1ヌクレオシドの伝導性オリゴマーへの添加；4)核酸を形成するための付加的ヌクレオシドの第1ヌクレオシドへの添加；5)伝導性オリゴマーの金電極への付着を含む。これはまた実施例に記載のように、ヌクレオシドの非存在下でも行い得る。

【0444】

上記の方法は、金電極への絶縁分子の結合にも使用し得る。

【0445】

好ましい実施態様において、伝導性オリゴマー（および所望により絶縁体）を含む単層を電極に添加する。一般に、添加の化学は、伝導性オリゴマーの電極への添加と類似か同じであり、即ち、金電極への結合に硫黄原子を使用するなどである。核酸に共有結合した伝導性オリゴマーに加えて、単層を含む構成物を、少なくとも5つの方法の一つでなし得る：(1)単層の添加、続く結合リンカー-核酸複合体の連続的添加；(2)結合リンカー-核酸複合体の添加、続く単層の添加；(3)単層と結合リンカー-核酸複合体の同時添加；(4)完全な核酸の付着に適した官能部で終了している付着リンカーを含む単層の形成(1, 2または3のいずれかを使用した)；または(5)核酸合成に適した官能部で終了している付着リンカーを含む単層の形成、即ち、核酸を当分野で既知のように単層表面で合成する。このような適当な官能部は、ホスホルアミダイト添加のためのヌクレオシド、アミノ基、カルボキシル基、保護硫黄部、またはヒドロキシル基を含むが、これらに限定されない。例としては、好ましい方法(1)を用いた金電極上の単層の形成を記載する。

【0446】

好ましい実施態様において、核酸はペプチド核酸または類似体である。この実施態様において、本発明は、少なくとも一つの共有結合したETMまたは結合リ

ンカーを有するペプチド核酸を提供する。好ましい実施態様において、これらの部分はPNAの単量体サブユニットに共有結合する。本明細書の「PNAの単量体サブユニット」は、 $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{COCH}_2-\text{塩基})-\text{CH}_2-\text{CO}-$ 単量体またはPNAの誘導体(ここでは「ヌクレオシド」の定義内に含まれる)を意味する。例えば、PNA主鎖の炭素原子の数を変え得る；一般に、PNA誘導体の数を記載したNielsen et al., Chem. Soc. Rev. 1997, page 73 参照、出典明示により本明細書の一部とする。同様に、塩基を主鎖に結合させるアミド結合を変え得る；ホスホロアミドおよびスルファアミド結合を使用し得る。あるいは部分を内部単量体サブユニットに結合する。本明細書で「内部」は、単量体サブユニットがN-末端単量体サブユニットまたはC-末端単量体サブユニットでないことを意味する。本実施態様において、部分を単量体サブユニットの塩基または主鎖に付着できる。塩基への付着は、本明細書に概説のように、または文献から既知のように行う。一般に、部分を塩基に添加し、これを次いで本明細書に概説のようにPNAに包含させる。塩基は、化学置換基の添加前またはその後、PNA合成反応への包含に必要なように保護されているか、包含されるように誘導体化されている。塩基の保護および誘導体化をPCT US 97/20014に示す。塩基を次いで単量体サブユニットに包含できる。

【0447】

好ましい実施態様において、部分はPNA単量体の主鎖に共有結合する。結合は、一般に、単量体サブユニットの非置換炭素原子の一つ、好ましくは主鎖の α -炭素に行われるが、1または2位の炭素、または塩基を主鎖に結合させるアミド結合の α -炭素での結合もなし得る。PNA類似体の場合、他の炭素または原子も同様に置換し得る。好ましい実施態様において、部分を、 α -炭素原子に末端単量体サブユニットまたは内部の末端単量体サブユニットへ添加する。

【0448】

この実施態様において、修飾単量体サブユニットを、ETM、結合リンカーまたはその結合のための官能基で合成し、次いで塩基を添加し、修飾単量体を成長しているPNA鎖に包含させ得る。

【0449】

製造した共有結合部分を有する単量体サブユニットを、Will et al., Tetrahedron 51(44): 12069-12082 (1995)およびVanderlaan et al., Tet. Let. 38: 2249-2252 (1987) (両方ともその全体を出典明示により本明細書の一部とする)に概説のような方法を使用して、PNAに包含させる。これらの方法は、ペプチド核酸への化学置換基の添加を、化学置換基を破壊させることなく可能にする。

【0450】

当業者に認められるように、電極は、核酸、伝導性オリゴマーおよび絶縁体の任意の組み合わせを有するように製造し得る。

【0451】

本発明の組成物は、更に、一個以上の標識を任意の位置で含み得る。本明細書での「標識」は、化合物の検出を可能にするために結合した元素(例えば、アイソトープ)または化学化合物を意味する。好ましい標識は放射活性同位体標識、着色または蛍光色素である。標識は、任意の位置で化合物に包含し得る。加えて、本発明の組成物は、架橋剤のような他の部分も含み得、標的プローブ複合体の架橋を促進する。例えば、Lukhtanov et al., Nucl. Acids. Res. 24(4): 683 (1996)およびTabone et al., Biochem. 33: 375 (1994)参照、両方とも出典明示により本明細書の一部とする。

【0452】

一旦製造されると、構成物は本明細書に記載のように、多くに適用されて使用される。特に、本発明の構成物は、標的被検体検出(特に核酸標的配列)用の結合アッセイで使用される。当業者には明らかなように、電極は、結合リガンドの単一種、または多数の結合リガンドの種(すなわち、アレイ方式)を有するようにつくられ得る。

【0453】

加えて、本明細書に概説のように、電極のような固体支持体の使用は、これらの遺伝子アッセイのアレイ形での使用を可能にする。オリゴヌクレオチド配列の使用は、当分野で既知である。加えて、電極内に位置を「アドレス参照」するため、および電極の表面修飾のための方法は既知である。従って、好ましい実施態様において、核酸を含む異なる結合リガンドのアレイは、電極の下に置かれ、そ

の各々は付着リンカーを介して電極に共有結合する。この実施態様において、多くの異なる結合リガンドは、1から数千に広く変化し得、好ましくは約4から約100,000、および特に好ましくは約10から約10,000である。

【0454】

少なくとも1つの標的被検体と1つの標識プローブを含む本発明のアッセイ複合体が形成されると、検出が電子的イニシエーションにより進行する。メカニズムまたは理論に制限されないが、検出は、ETMから電極への電子伝達に基づいており、「 π 軌道」の介在を含んでいる。

【0455】

電子伝達、すなわち、ETMの存在の検出は一般に好適な電圧により電子的に開始される。電位はアッセイ複合体に加える。加えられる電位の正確な制御と変化はポテンシostatおよび3つの電極システム（1つは参照用、1つはサンプル用（または実施用）、1つは対向電極用）または2つの電極システム（1つはサンプル用、1つは逆電極用）による。このことにより、一部ETMの選択に左右されるシステム、そして一部使用した伝導性オリゴマー、単層の組成と整合性、およびどのタイプの参照電極を使用したかに左右されるシステムのピーク電位に、印加した電位がマッチするようになる。本明細書に記載のように、フェロセンが好ましいETMである。

【0456】

好適な態様においては、共還元体または共酸化体（統合して、共酸化還元体）を追加の電子源または吸込みとして用いる。一般的には、Sato et al., Bull. Chem. Soc. Jpn 66: 1032 (1993); Uosaki et al., Electrochimica Acta 36: 1799 (1991); and Alleman et al., J. Phys. Chem. 100: 17050 (1996)（これらすべてを出典明示により本明細書の一部とする）参照。

【0457】

好ましい実施態様において、溶液中の入力電子源が電子伝達の開始に用いられる。好ましくは、直流電流を用いるか、または拡散が制限されない交流周波数で開始および検出がなされるときである。一般に、当業者に了知されるであろうように、好ましい実施態様で「孔」含有の単層を用いると、システムの短絡が回避

できる。これはいくつかの一般的な方法で行うことができる。好ましい実施態様において、入力電子源は、標識プローブのETMよりも低いと同じレドックス電位を有する。このように、入力電子源のレドックス電位以上の電圧において、ETMおよび入力電子源が酸化されて電子を与え得る。ETMは電極に電子を与え、入力源がETMに与える。例えば、実施例中に記載した本発明の構成物に結合したETMとして、フェロセンは、水溶液中で大略200mVのレドックス電位を有する（フェロセンが結合したもの、結合の方法およびなんらかの置換基の存在によって非常に変化する）。電子源のフェロシアニドは、同様に約200mVのレドックス電位を有する。従って、約200mVまたはそれ以上の電圧において、フェロセンはフェリセニウムに変わり、電子を電極に伝達する。フェリシアニドを酸化して電子をETMに伝達することができる。この方法において、電子源（または同時還元剤）はシステムに生じたシグナルを増幅するために働き、電子源分子が核酸に結合したETMに電子を迅速に、かつ繰り返して伝達する。電子の供与・受容の速度は、同時還元剤の拡散の速度すなわち同時還元剤とETMとの間の電子伝達に制限される。電子伝達は濃度および大きさなどの影響を受ける。

【0458】

他方、ETMよりも低いレドックス電位を有する入力電子源が用いられる。ETMのレドックス電位よりも低い、電子源のレドックスよりも高い電圧において、フェロシアニドなどの入力源は酸化され得ず、ETMに電子を与え得ない。すなわち電子伝達が起きない。フェロセンが酸化されると、電子の伝達経路ができる。

【0459】

他の好ましい実施態様において、入力電子源は、標識プローブETMよりも高いレドックス電位を有する。例えば、電子源のルミノールは大略720mVのレドックス電位を有する。ETMのレドックス電位よりも低い電圧、すなわち200-720mVにおいては、電圧がルミノールのレドックス電位よりも低いので、ETMはルミノール電子源から電子を受けることができない。しかし、ルミノールのレドックス電位またはそれ以上で、ルミノールはETMに電子を伝達し、

迅速かつ反復の電子伝達を可能とする。この方法において、電子源（または同時還元剤）はシステムで生じたシグナルを増幅するのに働き、電子源分子は標識プローブのETMに迅速にかつ反復して電子を供与する。

【0460】

ルミノールは酸化に際して化学的発光種になるという別の利点もあり（Jirka et al., *Analytica Chimica Acta* 284:345(1993) 参照）、ETMから電極への電子伝達の光学的検出が可能となる。ルミノールが電極に直接接触しない限り、すなわち電極への効率的な電子伝達経路がないようなETMの存在において、アッセイ複合体上のETMに電子を伝達することのみによりルミノールは酸化される。ETMが存在していない（即ち、標的配列が本発明の組成物をハイブリダイズしない場合）と、ルミノールは顕著に酸化されないで、ルミノールからの光子放出が少なくなり、その結果（もしあれば）シグナル放出が少なくなる。標的の存在で非常に大きいシグナルが生じる。このように光子放出によるルミノール酸化の測定は、電極に電子を与えるETMの能力についての間接的な測定となる。さらに、光子検出は一般的に電子検出よりも感度がよいので、システムの感度が増大する。最初の結果から、発光が過酸化水素濃度、pHおよびルミノール濃度（これは直線的ではない）に依存していることが示唆される。

【0461】

適切な電子源分子は周知であり、フェリシアニドやルミノールが含まれるが、これらに限定されない。

【0462】

他方、出力電子受容体を用いることができる。すなわち上記反応を逆に行う。電極から電子を受けるメタロセンなどのETMを用いる。電子を迅速に繰り返し受ける出力電子受容体でメタロセンをメタリセニウムに変える。この実施態様では、コバルトイセニウムが好ましいETMである。

【0463】

単層の表面のETMの存在は、種々の方法によって検出することができる。光学的検出には、これらに限定されるものではないが、例えば蛍光、燐光、発光、化学発光、電気発光および屈折率がある。電子的検出には、これらに限定される

ものではないが、アンペロメトリー、ボルタメトリー、キャパシタンス、インピーダンスがある。これらの方法には、交流または直流の電流に基づく時間・周波数依存法、パルス法、ロックイン法、フィルター法（高パス、低パス、バンドパス）および時間分解蛍光などの時間分解法がある。

【0464】

1つの実施態様において、ETMから電極への電子の効率的な伝達は、ETMのレドックス状態に定型的変化をもたらす。ピビリジン、ピリジン、イミダゾール環含有のルテニウム錯体を含む多くのETMでは、これらのレドックス状態の変化はスペクトルの変化に関連している。吸収の顕著な相違がこれらの分子について還元状態と酸化状態の間にみられる。例えば、Fabrizzi et al., Chem. Soc. Rev. 1995 pp192-202 を参照のこと。これらの相違は、分子光度計あるいは光電子増倍管を用いて監視することができる。

【0465】

この実施態様において、電子供与体および受容体には、光学活性化すなわち開始について上記したすべての誘導体が含まれる。好ましい電子供与体および受容体は電子伝達を高感度で監視し得るレドックスについて大きいスペクトル変化を特徴としている。好ましい例に、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_4\text{py}$ および $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ がある。吸収によって監視される供給体または受容体のみが理想のスペクトル特性を有していることが理解されるべきである。

【0466】

好ましい実施態様において、電子伝達は蛍光定量で検出される。ルテニウムなどの遷移金属錯体の多くが明白な蛍光性を有する。従って、核酸に結合した電子供与体と受容体とのレドックス状態の電荷は、 $\text{Ru}(4,7\text{-bis(2-pyridyl)phenyl})_3^{2+}$ などによる蛍光を用いて、感度よく監視することができる。この化合物の生成は、標準的蛍光検出法によって容易に測定することができる。例えば、レーザー誘発蛍光は、標準的単細胞蛍光定量、「オンライン」蛍光定量（例えばクロマトグラフィーシステムに取りつけられたもの）でのフローあるいは96ウェル・イムノアッセイ用に市販されているものに類似の多サンプル「プレートリーダー」で記録することができる。

【0467】

他方、溶液中かまたは光ファイバーに付着した核酸プローブを有する光ファイバーセンサーを用いて、蛍光を測定することができる。蛍光は光ファイバーに結合した光学増倍管または他の光検出器を用いて監視することができる。これについての有利な点は、検出に用いられるサンプル量が極めて少量でよいことである。

【0468】

さらに、Molecular Dynamicから販売されているFluorImagerなどの走査蛍光検出器が固体表面に並んだ修飾核酸分子の蛍光を監視するのに非常に適している。このシステムの利点は、何千もの別異の核酸プローブでカバーされたチップを一度に用いて多数の電子伝達プローブを走査できることである。

【0469】

多くの遷移金属錯体が大きいStokesシフトでもって蛍光を現す。適当な例として、ルテニウムなどの遷移金属のビスおよびトリスフェナントロリン錯体、およびビスおよびトリピリジン錯体がある (Juris, A., Balzani, V., et al. Coord. Chem. Rev., V. 84, p. 85-277, 1988 参照)。好ましい例では、効率的な蛍光 (合理的に高い量子収量) および低い再構築エネルギーを示す。これらには、 $Ru(4, 7\text{-ビフェニル}_2\text{-フェナントロリン})_3^{2+}$ 、 $Ru(4, 4'\text{-ジフェニル}_2, 2'\text{-ピリジン})_3^{2+}$ および白金錯体がある (Cummings et al., J. Am. Chem. Soc. 118:1949-1960(1996) 参照)、出典明示により本明細書の一部とする)。他方、ハイブリダイゼーションに関連する蛍光の低下は、これらのシステムを用いて測定できる。

【0470】

別の実施態様において、電子化学発光が電子伝達検出の基礎として用いられる。 $Ru^{2+}(bpy)_3$ などのETMのいくつかで直接発光に励起状態の低下がおきる。この性質の変化は、核酸ハイブリダイゼーションに関連しており、簡単な光学増倍管で監視することができる。(Blackburn, G.F. Clin. Chem. 37:1534-1539(1991); および Juris et al., 前出、参照)。

【0471】

好ましい実施態様において、電子検出に、アンペロメトリー、ボルタメトリー、電気容量およびインピーダンスなどが用いられる。好ましい技法として、これらに限定されるものでないが、電解重量分析、クーロメトリー（電位制御クーロメトリーおよび定電流クーロメトリーを含む）、ボルタメトリー（サイクリックボルタメトリー、パルスボルタメトリー（通常パルスボルタメトリー、矩形波ボルタメトリー、示差パルスボルタメトリー、Osteryoung 矩形波ボルタメトリー、静電容量パルス法）、ストリッピング分析（アノードストリッピング、カソードストリッピング、矩形波ストリッピングボルタメトリー）、伝導率測定（電子的伝導、直接分析）、時間依存電子化学分析（クロノアンペロメトリー、クロノポテンシオメトリー、サイクリッククロノポテンシオメトリー、サイクリッククロノアンペロメトリー、交流ポログラフィー、クロノガルバメトリー、クロノクロメトリー）、交流インピーダンス法、電気容量法、交流ボランタメトリー、光学電子化学法がある。

【0472】

好ましい実施態様において、電子伝達の監視はアンペロメトリー検出で行われる。この検出法において、望む標的遺伝子を含有するサンプル中の核酸結合電極と対照（逆）電極との間の電位（単離された対照電極と比較して）が利用される。相違する効率の電子伝達が標的核酸の存在または不存在によって生じる。すなわち標的核酸の存在また不存在、および従って標識プローブ、が異なる電流をおこす。

【0473】

アンペロメトリーで電子伝達を測定する器具は、感度のよい電流検出を含み、電圧電位を制御する手段、通常はポテンシオスタットを含む。この電圧は標識プローブ上の電子供与複合体の電位を参照することにより最適化される。電子供与複合体には、鉄、オスミウム、白金、コバルト、レニウム、レテニウムの錯体について上記したものを含まれ、鉄錯体が最も好ましい。

【0474】

好ましい実施態様において、他の電子検出法が用いられる。例えばポテンシオメトリー（すなわちボルタメトリー）には、非ファラデー法（ネット電流なし）

が含まれ、pHや他のイオン検出器において通常用いられる。同様のセンサーがETMと電極との間の電子伝達を監視するために用いられる。さらに、絶縁体（抵抗など）および伝導体（伝導、インピーダンス、電気容量）などの他の性質がETMと電極との間の電子伝達を監視するために用いられる。また、電流を生じるいかなるシステム（電子伝達など）も小さい磁場を生じ、ある実施態様で監視され得る。

【0475】

本発明の組成物で見られる電子伝達の速い速度がもたらす一つの利点は、時間分解能が吸収、蛍光あるいは電子流などによるモニターにおけるシグナル対ノイズ結果を非常に高め得ることである。本発明の電子伝達の速い速度は、高度のシグナルと電子伝達開始・完了間の定型的遅延とをもたらす。特定の遅延のシグナルを増幅することにより、電子伝達のパルス開始および「ロックイン」増幅検出およびフーリエ変換がなされる。

【0476】

好ましい実施態様において、電子伝達は交流電流（DC）法を用いて始められる。理論によって限定されないが、電極に連結したETMは、抵抗とコンデンサーを含む回路を流れる交流電圧と同様に反応する。基本的に、これらの抵抗とコンデンサーとして働く複合体の性質を測定し得る方法は、検出の基本とすることができ。驚くべきことに、従来からの電気化学理論、例えば、Laviron et al., J. Electroanal. Chem. 97:135(1979) および Laviron et al., J. Electroanal. Chem. 105:35(1979)（出典明示により本明細書の一部とする）は、非常に小さい E_{AC} （10mV以下）および比較的多数の分子を除き、本明細書に記載のシステムのモデルとはならない。すなわち、交流電流（I）は、Lavironの式に正確には記載されていない。このことは、この理論が電子の限界のない供給源と吸込みを想定していることに部分的には由来するものであり、これは本発明のシステムには当てはまらない。

【0477】

これらのシステムのよいモデルとなる交流電圧理論は、O' Connor et al., J. Electroanal. Chem. 466(2):197-202 (1999)（出典明示により本明細書の一部と

する)に概略説明されている。これらのシステムを予測する式を、式1として下に示す:

式1

【数1】

$$i_{\text{平均}} = 2nF N_{\text{全}} \cdot \frac{\sinh\left[\frac{nF}{RT} \cdot E_{\text{AC}}\right]}{\cosh\left[\frac{nF}{RT} \cdot E_{\text{AC}}\right] + \cosh\left[\frac{nF}{RT} (E_{\text{DC}} - E_0)\right]}$$

式1中で、 n はレドックス分子毎の酸化または還元電子数、 f は適用振動数、 F はファラデー定数、 $N_{\text{全}}$ はレドックス分子の総数、 E_0 はレドックス分子の形式的電位、 R はガス定数、 T はKelvin度数での温度、そして E_{DC} は電極電位である。このモデルは実験データと非常によく適合している。ある場合に、電流が予測より小さくなるが、これは、フェロセンの減少によるものであり、多くの方法で回復させ得る。

【0478】

加えて、ファラデー電流も、式2に示すとおり、時間の関数として表わすことができる:

式2

【数2】

$$I_f(t) = \frac{q_e N_{\text{全}} nF}{2RT(\cosh\left[\frac{nF}{RT} (V(t) - E_0)\right] + 1)} \cdot \frac{dV(t)}{dt}$$

I_f はファラデー電流であり、 q_e は電気素量である。

【0479】

しかし、電子伝達速度の影響も機器による因子も、式1に組み入れられてない。電子伝達速度は、応用周波数に近い、それより低いと、重要である。このように真の i_{AC} は下記の式12に示すような3因子の関数である。

式3

$$i_{\text{AC}} = f(\text{Nernst因子}) f(k_{\text{ET}}) f(\text{機器因子})$$

【0480】

これらの式は、交流素子および直流素子を含む入力信号を利用するシステムにおける期待交流電流をモデル化し、予測できる。上記したように、驚くべきことに従来の理論は、非常に低電圧の場合以外は、これらのシステムをまったくモデル化しない。

【0481】

一般に、非特異的に結合した標識プローブ/ETMは、ETMを含む標識プローブが正確な方向に特異的に結合したときよりも、インピーダンスに相違を示す（すなわち、高いインピーダンス）。好ましい実施態様において、非特異的結合物質を洗い落とすと、無限大の効果的なインピーダンスをもたらす。このように、一般的に下記するように交流検出はいくつかの利点があり、それには、感受性の増加およびバックグラウンドのノイズを「濾去する」能力が含まれる。特に、インピーダンスの変化（例えばバルクインピーダンスを含む）を、ETM含有プローブの非特異的結合と標的特異的アッセイ複合体形成の差として監視できる。

【0482】

従って、交流開始および検出方法を用いると、システムの周波数応答がETM存在の結果として変化する。「周波数応答」は、電極とETMとの間の電子伝達の結果としての信号の変化を意味する。この変化は信号周波数に従って相違する。周波数応答には、1以上の周波数での交流電流、位相シフト、直流オフセット電圧、ファラデーインピーダンス等が含まれる。

【0483】

標的配列および標識プローブを含むアッセイ複合体がつくられると、第1入力電子信号はシステムに用いられ、好ましくは少なくともサンプル電極（本発明の複合体を含む）および逆電極を介してシステムに用いられ、電極とETMとの電子伝達を開始される。電極システムも対照および実施電極に適用される電圧で用いられる。第1入力信号は少なくとも1つの交流素子を含む。交流素子は変化し得る振幅と周波数である。一般的に、本発明方法での使用において、交流振幅は約1mV-1.1Vであり、約10mV-800mVが好ましく、特に約10-500mVが好ましい。交流周波数は約0.01Hz-100KHzで

あり、約10Hz-10MHzが好ましく、約100Hz-20MHzが特に好ましい。

【0484】

交流と直流シグナルとの組み合わせ使用は、驚くべき感受性とシグナル最大化を含む種々の利点がある。

【0485】

好ましい実施態様において第1入力シグナルは交流素子および直流素子を含む。すなわち、サンプルと逆電極直流オフセット電圧は、ETM（例えば、フェロセンを用いると、掃引は一般に0から500mV）（あるいは、作動電極をグラウンドすると、対照電極は0から-500mVで掃引される）の電子化学的電位を介して掃引される。この掃引はシステムの最大応答が見られる直流電圧を同定するのに用いられる。これは一般にETMの電子化学的電位かその周辺である。この電圧が測定されると、掃引または1以上のユニホーム直流オンセット電圧が用いられる。直流オンセット電圧は約-1Vから+1.1Vであり、約-500mVから+800mVが望ましく、約-300から500mVが特に望ましい。好ましい実施態様において直流オンセット電圧はゼロではない。直流オンセット電圧のトップで、変化し得る振幅および周波数のシグナル交流素子が適用される。もしETMが存在して交流摂動に応答し得ると、電極とETMとの間の電子伝達によって、交流電流が生じる。

【0486】

確立したシステムにおいて、ETM（即ち標的配列の存在する）核酸の有無を識別するのに、単一の入力シグナルを用いて十分である。他方、複数の入力シグナルも適応される。これには、多くの種類があり、多重周波数、多重直流オフセット電圧、多重交流振幅あるいはこれらの組合せが用いられる。

【0487】

このように好ましい実施態様において、多重直流オンセット電圧を用いると、直流電圧掃引が好ましい。これは単一の周波数または2以上の周波数で行われる。

【0488】

好ましい実施態様において、交流振幅は変更することができる。理論にとらわれることなく、振幅を上げると推進力が増すようである。高い振幅は高い過電位をもたらし、電子伝達に速い速度を与える。一般的に同じシステムがその周波数での高い過電位の使用を介して単一の周波数での応答を改善する（すなわち、より高い出力シグナル）。振幅が高周波数で増すと、システムを通しての電子伝達を増し、感受性が大きくなる。さらに、例えば、これは、適当な空間のある配置を有さないような遅いシステムでの応答を惹起するのに用いられる。

【0489】

好ましい実施態様において、システムの測定は、少なくとも2つの単離した振幅または過電位でなされる。複数の振幅が好ましい。上記したように、振幅変化の結果としての応答の変化は、システムの同定、校正および定量の基礎を形成する。さらに1以上の交流周波数を同様に用いることができる。

【0490】

好ましい実施態様において、交流周波数は様々である。相違する周波数において、異なる分子が異なる方法で応答する。当業者に了知されるであろうように、周波数が増すと出力電流は一般に増加する。しかし、電極とETMに電子が行き来する速度よりも周波数が大きいつきは、高い周波数は出力シグナルの喪失または低下をもたらす。ある時点で周波数がETMと電極との間の電子伝達の速度よりも大きくなり、出力シグナルも低下する。

【0491】

ある実施態様において、検出に単一周波数における出力シグナルの単一測定を用いる。すなわち、標的配列の不存在と従ってETMを含む標識プローブの不存在でのシステムの周波数応答はあらかじめ測定でき、特定の高周波数で非常に低い。この情報を用いると、特定の周波数応答がアッセイ複合体の存在を示す。すなわち、特定の周波数でのすべての応答はアッセイ複合体を特徴付ける。単入力高周波数を用いることのみが必要であり、すべての周波数応答のなんらかの変化は、分析物が存在すること、標的配列が存在することを示す。

【0492】

さらに交流技法を用いると、ETM以外の物質によるすべての単一周波数での

バックグラウンドシグナルの顕著な低下をもたらす。すなわち、望まないシグナルの「閉め出し」または「濾去」である。溶液中の電荷キャリアすなわちレドックス活性分子の周波数応答が、その拡散係数および電荷伝達係数によって制限される。従って、高周波数では、電荷キャリアはその電荷を電極に伝達するのに十分速く拡散し得ず、および／または電荷伝達速度が十分に速くない。このことは、適切な単層を用いない場合あるいは部分的または不完全な単層を用いる場合、すなわち溶媒が電極に到達し得ない場合に著しい。すでに概記したように、直流技法において、電極に溶媒が到達し得る「孔」の存在は、溶媒電荷キャリアがシステムを「短絡」する結果をもたらすことがある。すなわち、電極への到達およびバックグラウンドシグナルの生成である。しかし、現在の交流技法を利用すると、1以上の周波数が選ばれて、単層の存在・不存在にかかわらず溶液中の1以上の電荷キャリアの周波数応答を防ぐ。このことは血液などの多くの生物体液が、アンペロメトリー検出を妨害し得るレドックス活性分子を顕著な量で含有しているので、特に意味がある。

【0493】

好ましい実施態様において、システムの測定は少なくとも2つの単離された周波数で行われ、複数の周波数の測定が好ましい。複数の周波数には走査がある。例えば交流電流は、1-20 Hzなどの低い入力周波数で、10-100 kHzなどの高い周波数での出力シグナルに対する応答と比較すると、ETMの存在の有無による周波数応答の相違を示す。好ましい実施態様において、周波数は少なくとも2、好ましくは約5、さらに好ましくは少なくとも約10周波数で測定される。

【0494】

電子伝達を開始するために入力シグナルを伝導した後に、出力シグナルが受けられ、すなわち検出される。出力シグナルの存在および増大は多くの因子に依存する。すなわち、入力シグナルの過電位／振幅；入力交流シグナルの周波数；介在媒体の組成；直流オンセット；システムの環境；ETMの性質；溶媒；塩の種類と濃度である。1つの与えられた入力シグナルにおいて、出力シグナルの存在および増大は、一般的にETMの存在の有無、単層表面からのETMの位置と距

離および入力シグナルの性質に依存する。いくつかの実施態様において、標識プローブの非特異的結合と標識プローブを含む標的特異的アッセイ複合体の形成との相違をインピーダンスに基づき識別することは、可能である。

【0495】

好ましい実施態様において、出力シグナルは交流電流を含む。上記したように、出力電流の大きさはパラメーターの数に依存する。これらのパラメーターを変えると、数においてシステムが最適化される。

【0496】

本発明で生じる交流電流は一般的に、約1フェムトアンペアー約1ミリアンペアにあり、約50フェムトアンペアー約100マイクロアンペアが好ましく、約1ピコアンペアー約1マイクロアンペアが特に好ましい。

【0497】

好ましい実施態様において、出力シグナルは入力シグナルに比較すると交流素子でシフトする位相である。理論にとらわれることなしに、本発明のシステムを十分に均一にすると、位相シフトの検出が可能となるようである。すなわち、本発明の電子伝達が起きるバイオ複合体は、均質に交流入力と反応し、これは標準の電子素子と同じであり、位相シフトが測定できる。このことは、ETMの存在の有無の検出の基礎として、および／または標識プローブを含む標的特異的アッセイ複合体の存在とシステム成分に対する物質の非特異的結合との差異として働く。

【0498】

出力シグナルは、ETMの存在に特有のものである。すなわち出力シグナルは、標識プローブとETMを含む標的特異的アッセイ複合体の存在に特有のものである。好ましい実施態様において、検出の基礎は、アッセイ複合体の形成の結果としてのシステムのファラデーインピーダンスの相違にある。ファラデーインピーダンスは、電極とETMのシステムのインピーダンスである。ファラデーインピーダンスはバルクすなわち2電子インピーダンスとまったく異なり、バルクインピーダンスは電極間のバルク溶液のインピーダンスである。多くの因子がバルクインピーダンスに作用しないファラデーインピーダンスを変えることができ、

その逆も可能である。このように核酸を含む本システムのアッセイ複合体は一定のファラデーインピーダンスを有し、これはETMと電極の距離、その電子的性質、介在媒体の組成などに依存している。本発明方法で重要なことは、ETMと電極との間のファラデーインピーダンスが、ETMを含む標識プローブが電極に特異的または非特異的に結合するかどうかにより非常に異なることである。

【0499】

従って、本発明はさらに、本発明の構成物を用いて被検体を検出するための電子器具または装置を提供する。この装置は、少なくとも第1測定すなわちサンプル電極および第2測定または逆電極を有する、サンプル溶液受取用の試験チャンバーを含む。3電極システムも用いられる。第1および第2測定電極は試験サンプル受け領域に接触し、液体試験サンプルの存在下で、2つの電気泳動電極は電子的に接触していてもよい。

【0500】

好ましい実施態様において、本明細書に記載のように、装置はまた、付着リンカーを介して共有結合した1本鎖核酸捕獲プローブを含む検出電極、および伝導性オリゴマーを含む単層も含む。

【0501】

装置は、試験チャンバーに、すなわち測定電極に、電氣的に連結した交流電圧源を含む。好ましくは、交流電圧源はオフセット電圧も同様に放出し得る。

【0502】

好ましい実施態様において、装置はさらに、入力シグナルと出力シグナルとを比較し得るプロセッサを含む。プロセッサは電極に結合しており、出力シグナルを受けるように配置され、表面ヌクレオシドの存在を検出する。

【0503】

従って本発明の組成物は、種々の研究、臨床、品質管理、野外試験などに用いられる。

【0504】

好ましい実施態様において、これらのプローブは遺伝子診断に使用される。例えば、本明細書中に開示した技術を使用して、プローブを、例えば、非腺腫性大

腸癌遺伝子、BRCA1 胸部癌遺伝子、各種の癌関連遺伝子であるP53、アルツハイマー病の最大リスク指標であるアポE4 遺伝子、などの標的配列を検出するために調製し、患者の前駆症状スクリーニング、嚢胞性腺維症遺伝子変異、あるいはその他の当技術分野で周知のすべてを容易にすることができる。

【0505】

別の実施態様では、ウイルスおよびバクテリアの検出を、本発明の複合体を使用して実施できる。この実施態様では、プローブは、各種ウイルスおよびバクテリアから標的配列を検出するためにデザインされる。例えば、現今の血液スクリーニングは抗HIV抗体の検出に依存している。本明細書中に開示した方法は、臨床サンプルのHIV核酸配列、殊に高度に保存性のHIV配列を検出する直接スクリーニングを可能とする。さらにこれは、抗ウイルス治療の効果を評価する改良方法として、患者の体内を循環しているウイルスを直接モニターすることを可能とする。同様に、白血病関連ウイルス、HLTV-IやHLTV-IIをこの方法で検出することができる。バクテリア感染症、例えば、結核、クリミディア (cylmidia) および他の性的伝染症も検出できる。

【0506】

好ましいある実施態様では、本発明の各核酸は、水あるいは食品サンプルのスクリーニングにおいて毒性バクテリア用のプローブとしても使用される。例えば、各サンプルは、バクテリアを溶解処理してその核酸を遊離させ、次いでバクテリア株を認識するようにプローブをデザインする。但し、該バクテリアは、Salmonella, Campylobacter, Vibrio cholerae, Leishmania, 腸毒性のE. Coli株、およびレジオネア病バクテリア、などの病原性株を含むがそれらに限定はされない。同様にして、本発明の構成物を使用して生体治癒戦術を、評価できる。

【0507】

さらなる実施態様では、犠牲者や容疑者から採取したサンプルについて、犯罪現場を一致させる法医学的「DNA指紋鑑定」に使用される。

【0508】

さらなる実施態様では、あるアレイ配列のプローブは、ハイブリダイゼーションによる配列決定に使用される。

【0509】

このように、本発明は、ある実施態様においては、ハイブリダイズしていないプローブを除去することなく標的配列を検出し得る、極めて特異的で感受性の高いプローブを提供するものである。これは、自動的な遺伝子プローブアッセイの形成に有用である。

【0510】

あるいは、本発明の組成物は、PCRで成功した遺伝子増幅を検出するのに有用であり、かくして成功したPCR反応を標的配列の存在または不存在の指標とすることができる。PCRはこのような手法で数種の方法に使用される。例えば、ある実施態様では、このPCR反応は当技術分野で知られているようにして実施され、次いで、標的核酸とETMとを含む本発明の構成物に加え、伝導性オリゴマーを介して電極に共有結合させ、続いて標的配列を検出する。あるいは、ETMで標識化したヌクレオチドを用い、電極の存在下にまたは続いて電極を加えるかのいずれかで、伝導性オリゴマー及び標的核酸とともにPCRを実施する。ETMを含有するPCR生成物の電極組成物との結合は、電子伝達により検出される。最終的に、伝導性ポリマーを介して電極に結合した核酸は、ETMで標識化した第2プライマーの添加により、PCRプライマーの1種となるだろう。伸長させると、ETMおよび共有結合した電極を有する2本鎖核酸を生じる。このような方法で、本発明は各標的配列のPCR検出に使用される。

【0511】

好ましいある実施態様では、これらの配列はmRNA検出に使用される。好ましいある実施態様は、これらのmRNAの3' ポリアデニル化末端近くにハイブリダイズする捕獲プローブまたは捕獲伸長プローブのいずれかを利用するものである。これにより、標的結合プローブの1種、即ち、mRNA標的のポリ-A末端と結合するポリ-T部分を含有するプローブ、を標的に使用することが可能となる。一般的に、このプローブは、好ましくは非ポリ-Tであり、検出プローブ（または他のプローブ）と結合する第2部分、を含有する。これにより、1種標的結合プローブの調製、および、異種プローブ合成実施量の減少が可能となる。

【0512】

好ましいある実施態様では、制限酵素およびライゲーション手法を使用することにより、「普遍的」アレイ配列の創製が可能となる。この実施態様では、図6に一般的に示した、制限エンドヌクレアーゼ末端を含む捕獲プローブを含む単層である。核酸の相補的部分を利用することにより、「粘着性末端」を残しつつ、制限エンドヌクレアーゼ部位のすべてを含むアレイ配列が調製される。これらの制限エンドヌクレアーゼの1種またはそれ以上で標的サンプルを処理することにより、それらの標的をアレイ配列に結合させることが可能となる。これは、標的の配列を知らなくても実施できる。それらの標的は、所望により、標準的手法例えばリガーゼを用いてライゲートされ得、そして標準的標識または本発明方法のいずれかを使用して標的配列を検出できる。

【0513】

本発明は、核酸類を感受性よく検出し得る方法を提供するものである。好ましい実施態様では、約 10×10^6 個以下、好ましくは約 10×10^5 個以下、より好ましくは約 10×10^4 個以下、特に好ましくは約 10×10^3 個以下、最も好ましくは約 10×10^2 個以下の分子が検出される。これは標的配列とレポーター分子との1:1相関を推認するものであり、もし各標的配列に対して1以上のレポーター分子（即ち、電子伝達分子）を使用すれば、感受性がより高くなるはずであることは、当業者には明らかであろう。

【0514】

現今、検出限界は刊行物発表されたDNAを介しての電子伝達率に基づいて評価されており、それは大まかに言って、8ベースペア分離につき 1×10^6 電子/秒/デュプレックスであり (Meade et al., Angw. Chem. Eng. Ed., 34:352 (1995) 参照)、高い推進力、約100 kHzの交流振動数を可能とするものである。予試験結果が示しているように、これらのシステムを介しての電子伝達は、極めて効率的であり、ほぼ 100×10^3 電子/秒に達し、非常に僅かの分子に対してもフェムトアンペアレベルの感受性をもたらす。

【0515】

本明細書中に引用したすべての参考文献は、参照によりそれらの全部を本書中の記載として導入する。

【0516】

実施例

実施例1

基板および単層の一般的作製法

基板上のSAM形成—一般手法

自己集合単層を清浄金表面に形成した。金表面は様々な異なる方法で調製することができる；溶融または研磨金線；ガラスまたは雲母またはシリコン・ウェハ—またはある種の他の基板にスパッタもしくは蒸着した金；回路基板物質またはガラスまたはシリコンまたはある種の他の基板に電気メッキもしくは無電解メッキした金。真空蒸着金サンプル（減圧およびスパッタ）および溶液析出金サンプル（無電解および電気メッキ）双方について、好適な機械的安定性を保証するために、基板と金との間に粘着層を使用しなければならない。クロム、チタン、チタン/タングステンまたはタンタルが多くの場合スパッタおよび蒸着金と共に採用される。電気メッキしたニッケルは通常電気メッキおよび無電解メッキした金と共に採用され、他の粘着物質が使用し得る。

【0517】

金基板は単層を形成する前に清浄にする。様々な異なる手法が採用されている。化学溶液による浄化が最も一般的である。ピランハ溶液（過酸化水素／硫酸）または王水（塩酸／硝酸）清浄化が最も一般的であるが、電気化学的方法、火炎処理、プラズマ処理法なども採用されている。

【0518】

清浄化に続いて、金基板を析出溶液中でインキュベートする。析出溶液は溶媒中種々チオールの混合物を含む。エタノールなどの有機溶媒中アルカンチオールの混合物が最も一般的な手法であるが、様々な変法も開発されている。替わり得る手法としてはアルカンチオールの気相析出、微小接触プリンティング、ニート・チオールを使用する析出、水性溶媒からの析出などであるが、2工程手法が開発されている。析出溶液におけるアルカンチオールの濃度はモルないしミクロモル以下の範囲であり、0.5～2.0ミリモルの範囲が最も一般的である。金基板はその手法に応じて1秒以下ないし数日間、析出溶液と接触させ、インキュベ—

ト／静置する。最も一般的な時間は1時間ないし一夜のインキュベーションである。インキュベーションは通常室温で実施するが、50℃までの温度が一般的である。

【0519】

DNAを含む混合単層は通常2工程手法により調製する。チオール化DNAは第1析出工程に際して析出し、混合単層形成はDNAを含まない第2チオール溶液を加える第2工程で完了する。第2工程は多くの場合緩和な加熱であり、単層の再構成を促進する。

【0520】

SAM形成の一般手法－有機溶液からの析出

浄化金表面を浄化バイアルに入れた。DNA析出有機溶媒溶液を調製し、総チオール濃度を400 μ Mと1.0 mMの間とした。析出溶液はチオール修飾DNAとチオール希釈分子とを含んでいた。DNAと希釈剤との比は通常10 : 1と1 : 10の間にあり、好ましくは1 : 1であった。好適な溶媒は、テトラヒドロフラン (THF)、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド (DMF) またはその混合物である。十分な量のDNA析出溶液をバイアルに加え、電極表面が完全に覆われるようにする。金基板は外界温度または僅かに高い温度で5～30分間インキュベートする。最初のインキュベーションの後、析出溶液を除き、希釈分子のみの有機溶媒溶液 (100 μ M～1.0 mM) を加える。金基板は室温または室温より高い温度で完全な単層が形成されるまで (10分ないし24時間) インキュベートする。金サンプルを溶液から取出し、浄化溶媒中ですすぎ、使用する。

【0521】

SAM形成の一般手法－水性溶液からの析出

浄化金表面を浄化バイアルに入れる。DNA析出水性溶液を調製し、総チオール濃度を1 μ Mと200 μ Mの間とする。この水性溶液は多くの場合、塩を含む (約1 M) が、精製水を使用してもよい。析出溶液はチオール修飾DNAとしればチオール希釈分子とを含んでいる。DNAと希釈剤との比は通常10 : 1と1 : 10の間にあり、好ましくは1 : 1である。電極表面が完全に覆われる容量

のDNA析出溶液をバイアルに加える。金基板は外界温度または僅かに高い温度で1～30分間インキュベートするが、通常5分で十分である。最初のインキュベーションの後、析出溶液を除き、希釈分子のみの水性溶液または有機溶媒溶液(10 μ M～1.0 mM)を加える。金基板は室温または室温より高い温度で完全な単層が形成されるまで(10分ないし24時間)インキュベートする。金サンプルを溶液から取出し、浄化溶媒中ですすぎ、使用する。

【0522】

Auボール電極上の単層

Auボール電極の創製：かみそりの刃を使用し、金線(直径127 μ m、99.99%純度、Aldrich から)を10 cmの長さに切断する。16ゲージの針を使用し、金線を#4天然ゴム隔壁(1/2 mLのPCRエッペンドルフ・チューブに適合するサイズ)に通す(これは金線を支持し、析出に際しチューブを密封する。下記参照)。浄化焼成火炎(メタンまたはプロパン)を使用し、金線の1センチメートルを溶融して金線末端に付着した球体を形成する。金線の長さを調整し、PCRチューブに封入したときに、金ボールが底部近傍に位置して20 μ Lの液体に没入し得るようにする。使用当日に、電極を王水(4:3:1のH₂O:HCl:HNO₃)に20秒間浸け、次いで水で十分にすすぐ。

【0523】

誘導化：PCRチューブ中、析出溶液(DMF中833 μ M総量で2:2:1 DNA/H6/M44)20 μ L量をPCRブロック上で50℃に5分間加熱する。次いで、各電極を析出溶液に浸け(金ボールが沈む程度—金線の「柄」はできるだけ短くする)、室温に移す。電極をPCRチューブに移す前に、DMF中200 μ Lの400 μ M-M44で15分間インキュベートする(金線の多くを同様に沈める)。M44中に室温で5分間放置し、次いで、PCRブロック上に載せ、HCLONGを実施する。電極をM44溶液から取出し、6×SSCに浸け、ハイブリダイゼーション溶液20 μ Lを入れたPCRチューブに入れる。ACV測定に先立ち電極を6×SSCに浸ける。

HCLONG: 65℃2'、-0.3℃/s～40℃、40℃2'、+0.3℃/s～55℃、55℃2'、-0.3℃/s～30℃、30℃2'、+0.3℃/s

～35℃、35℃2'、-0.3℃/s～22℃。

【0524】

回路基板の製造

両側に半オンスの銅箔をもつFR-4の18"×24"×0.047"パネル (General Electric) に明細 (Gerber files) どおりに穿孔した。FR-4パネルは無電解銅でメッキ (500マイクロインチ) して特定の穿孔を伝導性とし、次いでパネルにはさらに500マイクロインチの電気メッキ銅を貼り付ける。銅メッキに続いて、パネルは塩化第2銅エッチング (酸エッチング) により明細どおりにエッチングする。次いで、エッチングしたパネルに光沢剤を有する400マイクロインチの電気メッキニッケルを張付け、次いで50マイクロインチの軟質金 (99.99%純度) を貼り付ける。金パネルにはその両側に液状光画像形成蠟マスク (Probimer 52, Ciba-Geigy Co.) を被覆する。画像形成を明細どおりに実施する。直径250ミクロンの14個のセンサー電極と2個のより大きい電極 (直径500ミクロン) を、基板の縁で金貼付け接点につながる絶縁リード線と共に創製する。次いで、蠟マスク化パネルに明細どおりに刻み目を入れ、1"×1"の個々のウエアーを創製する。銀/塩化銀のペーストを2個の大きい方の電極 (ERCON R-414) の一方に塗付する。次いで、パネルをアルゴン/酸素プラズマ混合物でプラズマ浄化する。浄化に続いて、パネルは箔を内張りしたバッグに入れ使用時まで保存する。

【0525】

回路基板上の単層析出

回路基板を箔内張りバッグから取出し、10%硫酸溶液中に30秒間浸漬する。硫酸処理に続き、基板をミリーQ水に2回それぞれ1分間浸漬する。基板は次いで窒素気流下で乾燥する。基板を調湿チャンバー内のX-Yテーブルに置き、DNA析出溶液の30ナノリットル液滴を14個の電極それぞれに載せる。DNA析出溶液は、33μMチオール化DNA、33μM2ユニットのフェニルアセチレンワイヤ (H6)、および6×SSC (900mM塩化ナトリウム、90mMクエン酸ナトリウム、pH7) w/1%トリエチルアミン中の16μM-M44を含む。液滴を室温で5分間インキュベートし、次いで、液滴をミリーQ水浴中

ですすぎ取除く。基板をアセトニトリル中M44の45℃浴に浸漬する。30分後、基板を取出し、アセトニトリル浴に30秒、次いでミリQ水浴に30秒間浸漬する。基板を窒素気流下に乾燥する。

【0526】

実施例2

標的配列の検出

回路基板上の単層析出

上記のように、回路基板を箔内張りバッグから取出し、10%硫酸溶液中に30秒間浸漬する。硫酸処理に続き、基板をミリQ水に2回それぞれ1分間浸漬する。基板は次いで窒素気流下で乾燥する。基板を調湿チャンバー内のX-Yテーブルに置き、DNA析出溶液の30ナノリットル液滴を14個の電極それぞれに載せる。DNA析出溶液は、33 μ Mチオール化DNA、33 μ M2ユニットのフェニルアセチレンワイヤ(H6)、および6 \times SSC(900mM塩化ナトリウム、90mMクエン酸ナトリウム、pH7)w/1%トリエチルアミン中の16 μ Mウンデセン-1-エン-11-イルトリ(エチレングリコール)((H₂S-CH₂)₁₁-(OCH₂CH₂)₃-OH)を含む。3個の電極にDNA1(5'-ACCATGGACACAGAT(CH₂)₁₆SH-3')含有溶液をスポットした。4個の電極にはDNA2(5'-TCATTGATGGTCTCTTTTAAACA(CH₂)₁₆SH-3')含有溶液をスポットした。4個の電極にはDNA3(5'-CACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA(CH₂)₁₆SH-3')をスポットした。3個の電極にはDNA4(5'-TGTGCAGTTGACGTGGAT(CH₂)₁₆SH-3')をスポットした。析出溶液を室温で5分間インキュベートし、次いで、液滴をミリQ水浴中ですすぎ取除く。基板をアセトニトリル中M44の45℃浴に浸漬する。30分後、基板を取出し、アセトニトリル浴に30秒、次いでミリQ水浴に30秒間浸漬する。基板を窒素気流下に乾燥し、窒素ガスを吹き込んだ箔内張りバッグに使用時まで保存する。

【0527】

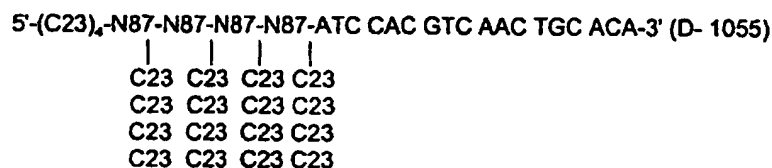
ハイブリダイゼーションおよび測定

修飾した基板を箔内張りバッグから取出し、射出成形サンプル・チャンバー（カートリッジ）を取付けた。チャンバーは両面粘着テープで基板に接着したが、その総容量は250マイクロリットルであった。ハイブリダイゼーション溶液を調製した。この溶液は10 nMのDNA標的（5' -TGTGCAGTTGACGTGGATTGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTCATCCAGT-3'）（D-998）、30 nMシグナル・プローブ（D-1055）および10 nM 5' -TCTACAG(N6)C(N6)ATCTGTGTCCATGGT-3'（N6はPCT/US99/01705の図1Dに示されている；ヌクレオシドのリボース2' 酸素に4炭素鎖により連結したフェロセンを含む）を含む。

【0528】

シグナリング・プローブは以下のとおりである：

【化44】



N87はリング構造を含む分枝点である。C23はPCT US99/01705の図1Fに示されている。25%キアゲン（Qiagen）溶解バッファーAL、455 mM-NaClO₄、195 mM-NaCl、1.0 mMメルカプトヘキサノールおよび10%仔ウシ血清を含む溶液中、250マイクロリットルの混成溶液をカートリッジに注入し、12時間ハイブリダイズさせた。12時間後、ハイブリダイズしたチップは切換え回路構成をもつ自家製相互コンダクタンス増幅器に挿し込んだ。相互コンダクタンス増幅器はコンピューターDAQからの直流ランプおよびロックイン増幅器（SR830 Stanford Instruments）からの交流正弦波を組み合わせる加算回路構成を備えていた。各電極は連続的に走査し、データをセーブし、ラブビュー（Labview）（National Instruments）を用い設計した自家製プログラムにより操作した。チップは直流-100 mVと500 mV（疑似Ag/AgCl参照電極）間で、25 mV（50 mVピーク対ピーク）、1000 Hz

z 重畳正弦波により走査した。出力電流はロックイン増幅器に供給し、1000 Hz シグナルを記録した (DCV 技法)。パッド各セットのデータを蓄積し、平均した。

【0529】

【表1】

	I _p	相対強度 I _p
DNA 1 (陽性 2Fc)	34 nA	0.11
DNA 2 (陰性 サンドイッチアッセイ)	218 nA	0.7
DNA 3 (陰性)	0.3 nA	0.001
DNA 4 (陽性 サンドイッチアッセイ)	317 nA	1

結果を図14に示す。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 2組の電極セット、電気泳動セットおよび検出セットの代表的な形状を描出する。

【図1B】 2組の電極セット、電気泳動セットおよび検出セットの代表的な形状を描出する。

【図1C】 図1Aの側面図を表す。

【図1D】 個々の電気泳動電極の使用を描出する。

【図1E】 図1Dの側面図である。

【図1F】 サンプルが1つの検出電極から他の電極に順次移動する構図を示す。

【図2】 サンプルの空間的標的化ならびに結合速度を上げる「混合」用に多次元配列した電気泳動電極の使用を描出する。

【図3A】 標的核酸配列を電極に結合させる好ましい実施態様を示す。

【図3B】 標的核酸配列を電極に結合させる好ましい実施態様を示す。

【図3C】 標的核酸配列を電極に結合させる好ましい実施態様を示す。

【図4A】 可能なメカニズム-1のシステムを描出する。

- 【図 4 B】 可能なメカニズム－１のシステムを描出する。
- 【図 4 C】 可能なメカニズム－１のシステムを描出する。
- 【図 4 D】 可能なメカニズム－１のシステムを描出する。
- 【図 5 A】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 B】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 C】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 D】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 E】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 F】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 G】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 5 H】 核酸メカニズム－２の態様を示す。
- 【図 6 A】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 B】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 C】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 D】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 E】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 F】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 G】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 6 H】 可能な非核酸メカニズム－２の態様を描出する。
- 【図 7 A】 標識プローブと E T M 付着の可能な構成を描出する。
- 【図 7 B】 標識プローブと E T M 付着の可能な構成を描出する。
- 【図 7 C】 標識プローブと E T M 付着の可能な構成を描出する。
- 【図 7 D】 標識プローブと E T M 付着の可能な構成を描出する。
- 【図 7 E】 標識プローブと E T M 付着の可能な構成を描出する。
- 【図 8 A】 技術上既知の「分枝」点ホスホラミダイトを用い、核酸に同時に多数の E T M を付加する代替法を図示する。
- 【図 8 B】 技術上既知の「分枝」点ホスホラミダイトを用い、核酸に同時に多数の E T M を付加する代替法を図示する。
- 【図 9 A】 「分枝」点ヌクレオシドを用いて複数の E T M を核酸に同時に

取り込ませる合成について図示する。

【図9B】 「分枝」点ヌクレオシドを用いて複数のETMを核酸に同時に取り込ませる合成について図示する。

【図9C】 「分枝」点ヌクレオシドを用いて複数のETMを核酸に同時に取り込ませる合成について図示する。

【図10】 ETMポリマーの付加を可能とする「分枝」点の合成を描出する。

【図11】 予め形成されたSAMに、一級アミンで機能化した核酸を付加させるために活性化カルボン酸エステルを使用した図である。

【図12】 代表的なヘアピン構造を描出する。

【図13A】 本発明のある実施態様を描出する。

【図13B】 本発明のある実施態様を描出する。

【図13C】 本発明のある実施態様を描出する。

【図13D】 本発明のある実施態様を描出する。

【図14】 実験例の結果を描出する。

【図15A】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15B】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15C】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15D】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15E】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15F】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図15G】 2電極システムの可能な配置を描写している。

【図16A】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図16B】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図16C】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図16D】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図16E】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図16F】 図15のシステムに似たシステムを描写する。

【図1】

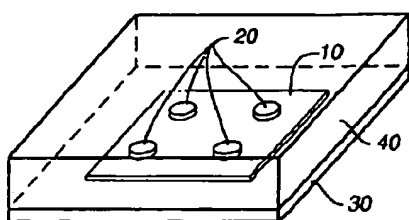


FIG. 1A

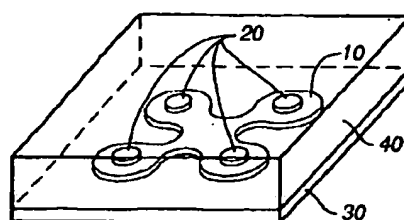


FIG. 1B

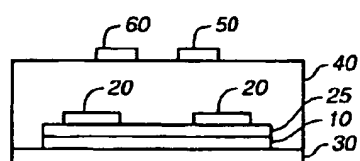


FIG. 1C

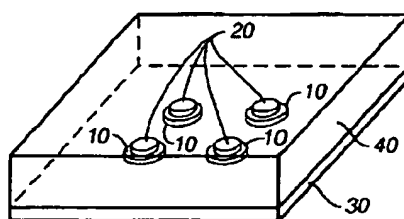


FIG. 1D

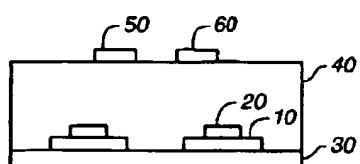


FIG. 1E

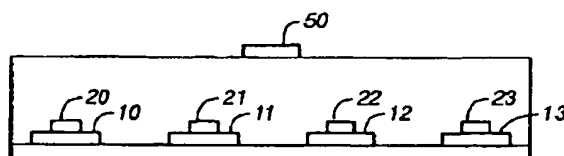


FIG. 1F

【図2】

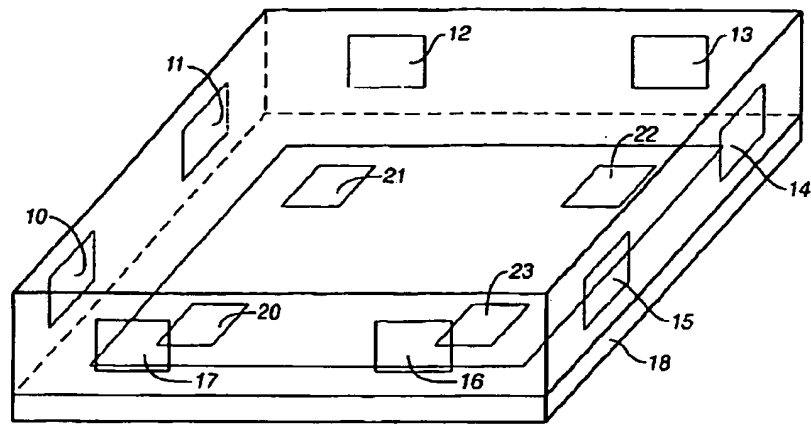
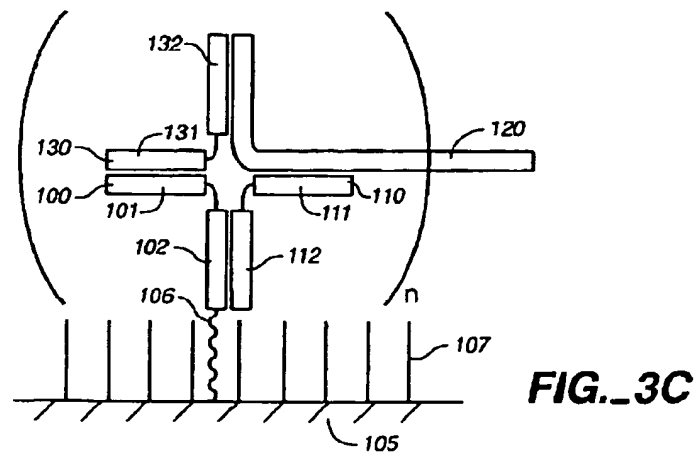
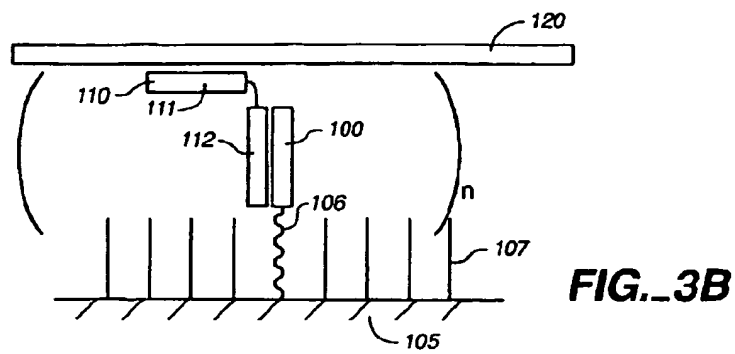
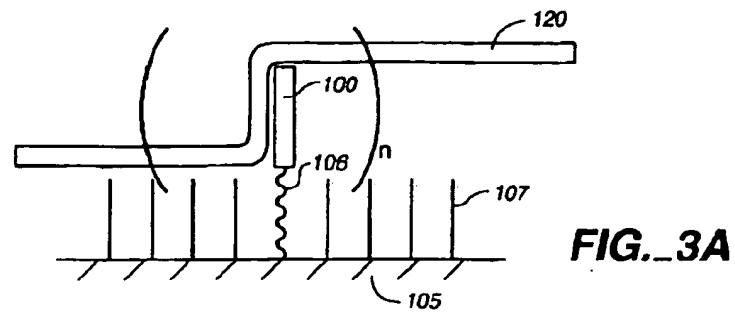


FIG._2

【図3】



【図4A-C】

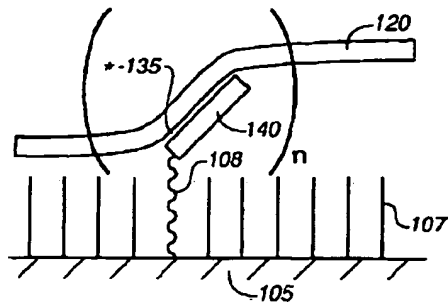


FIG. 4A

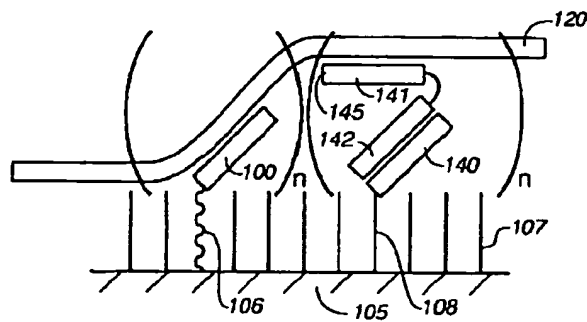


FIG. 4B

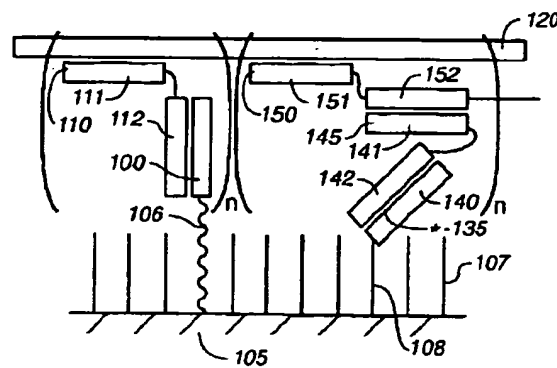
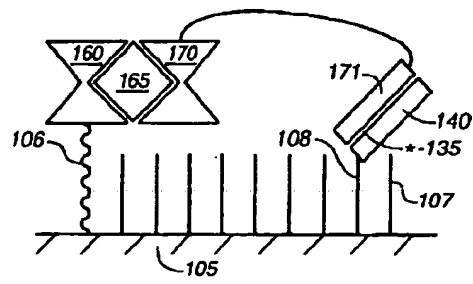
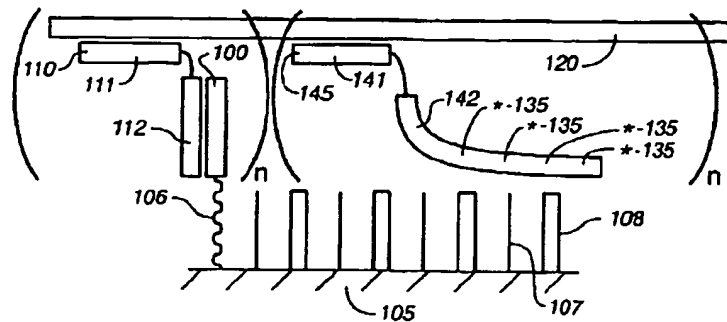
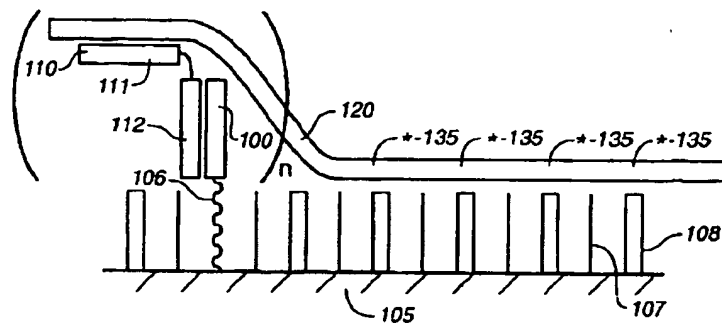
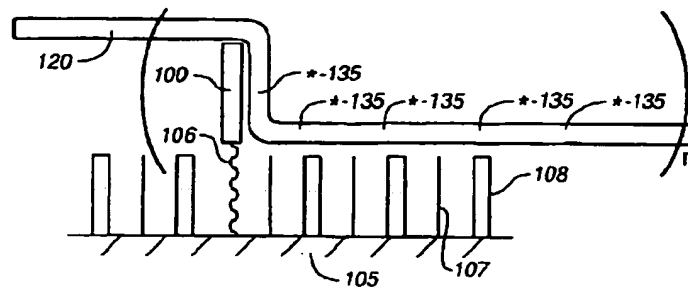


FIG. 4C

【図4D】

**FIG. 4D**

【図 5 A-C】



【図5D-F】

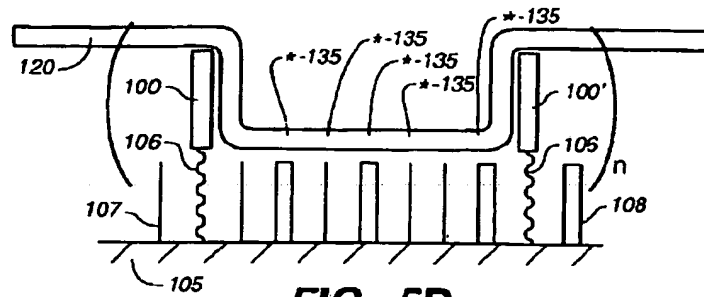


FIG. 5D

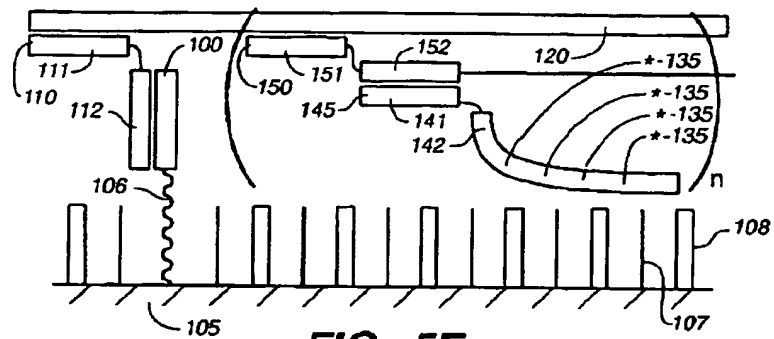


FIG. 5E

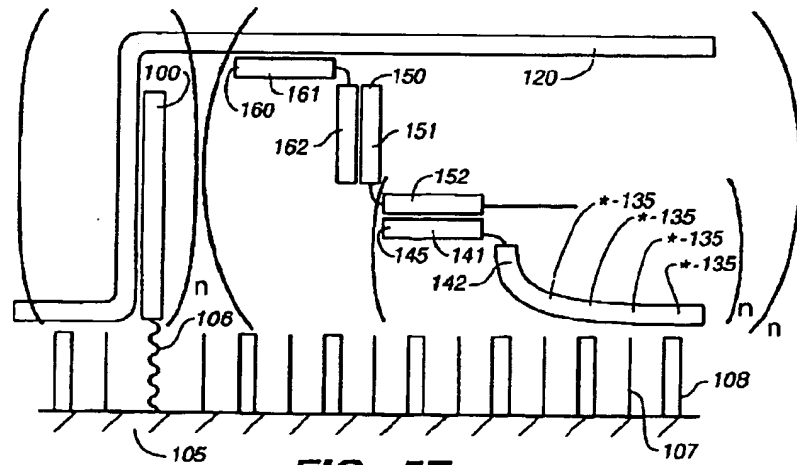


FIG. 5F

【図5G・H】

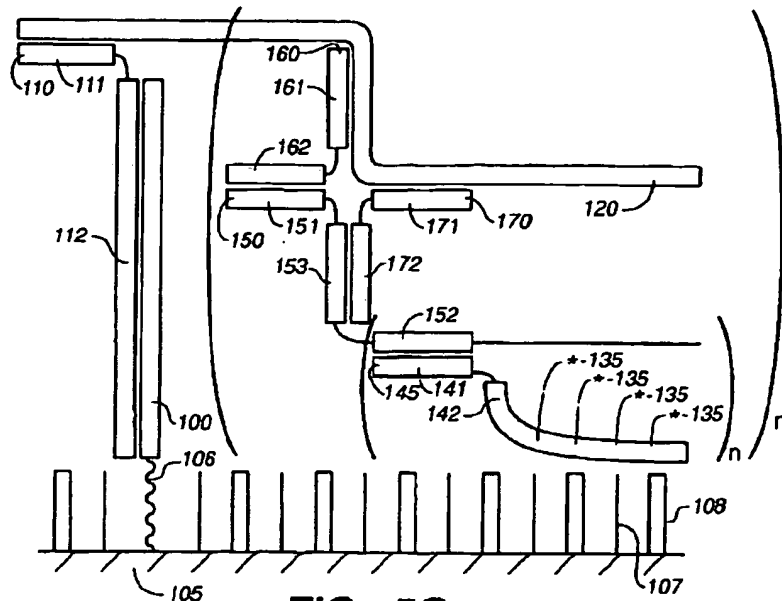


FIG. 5G

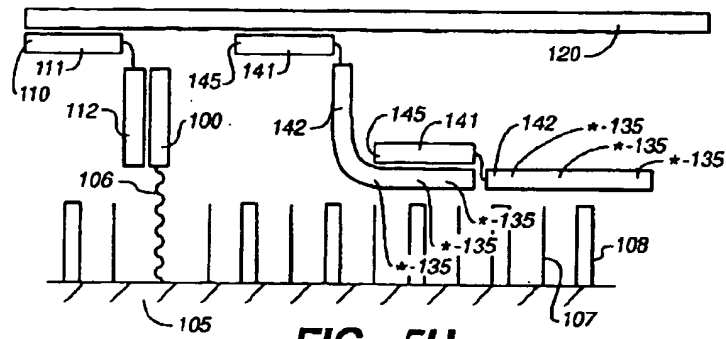
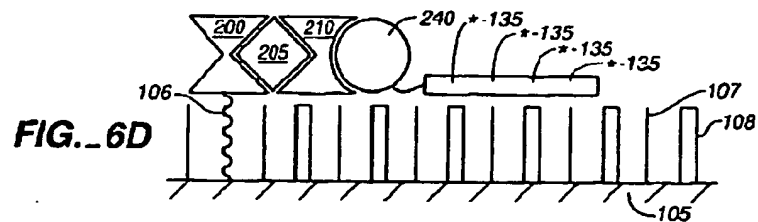
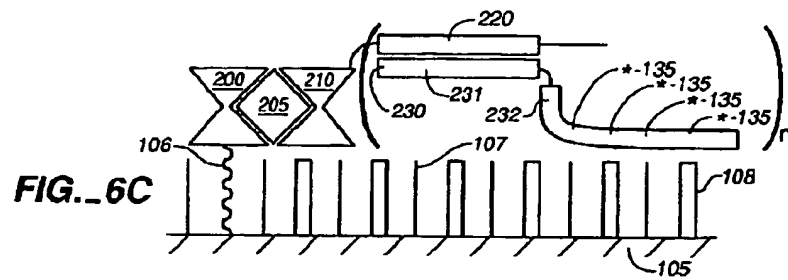
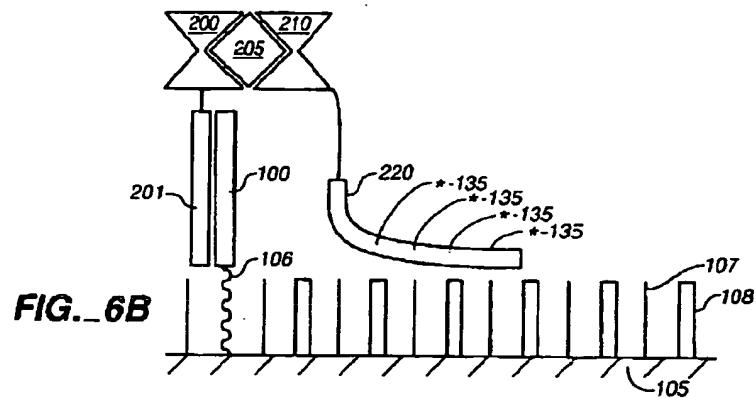
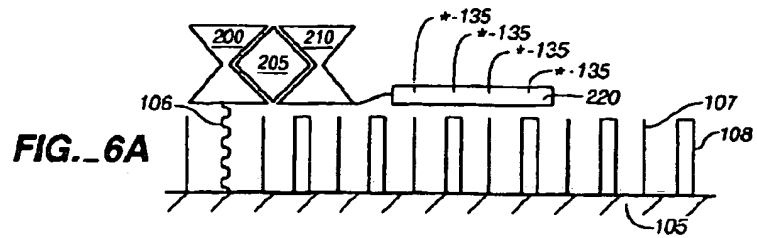
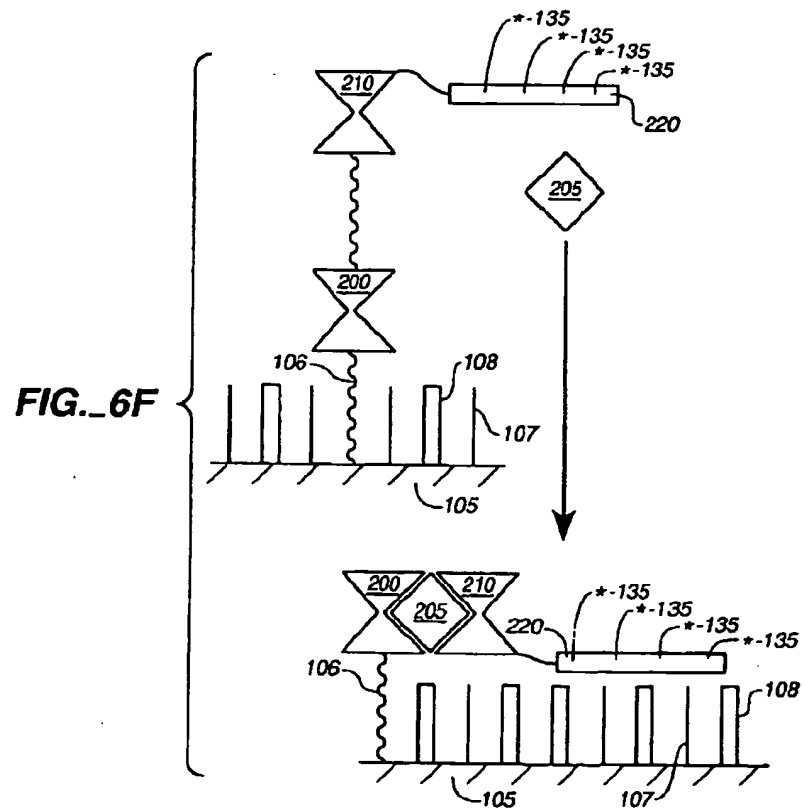
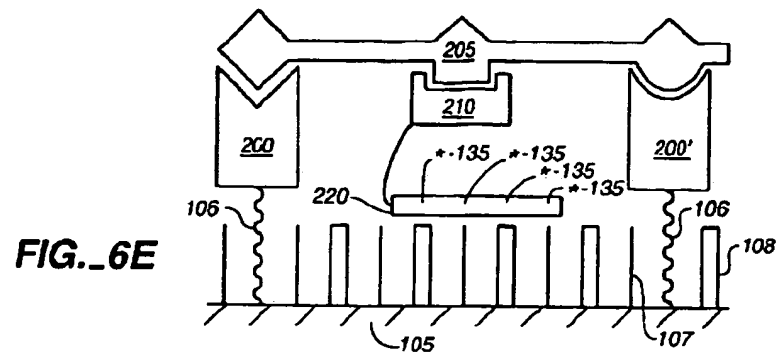


FIG. 5H

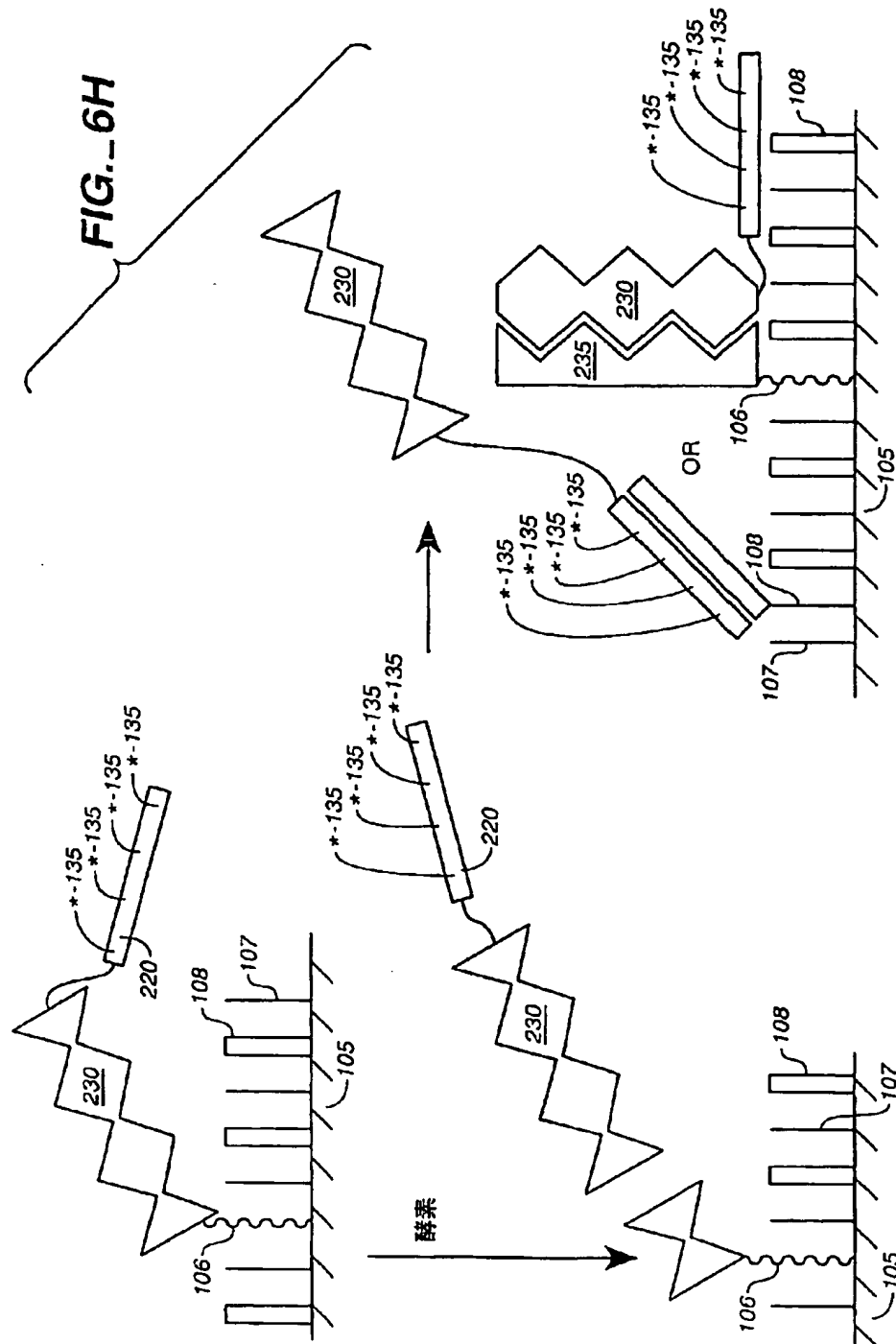
【図6A-D】





【図6E・F】

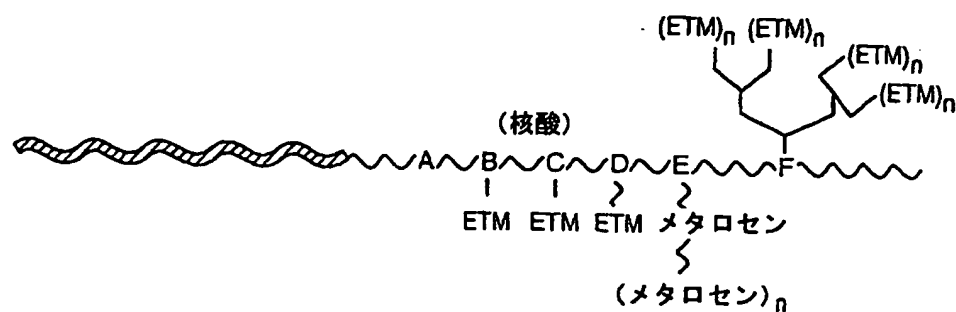


【図 6H】



【図 7 A】

 = 標識プローブの第1ハイブリダイズ可能部分
 = リクルートリンカー



A = ヌクレオシド置換
 B = 塩基への付着
 C = リボースへの付着
 D = リン酸への付着

E = リボース、リン酸、または塩基に
 付着したメタロセンポリマー
 F = リボース、リン酸、または塩基を
 介して付着した樹状構造

FIG. 7A

【図 7 B】

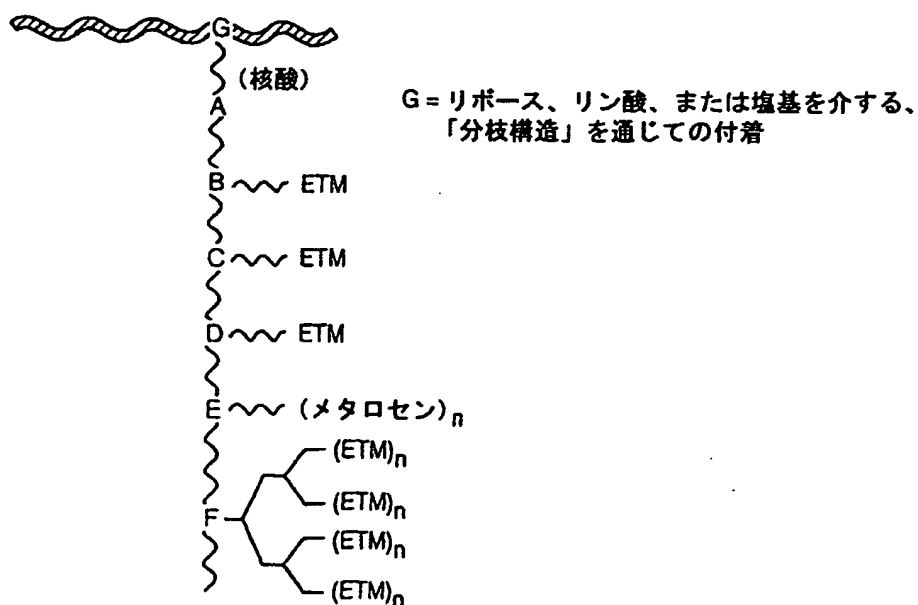


FIG. 7B

【図7C】

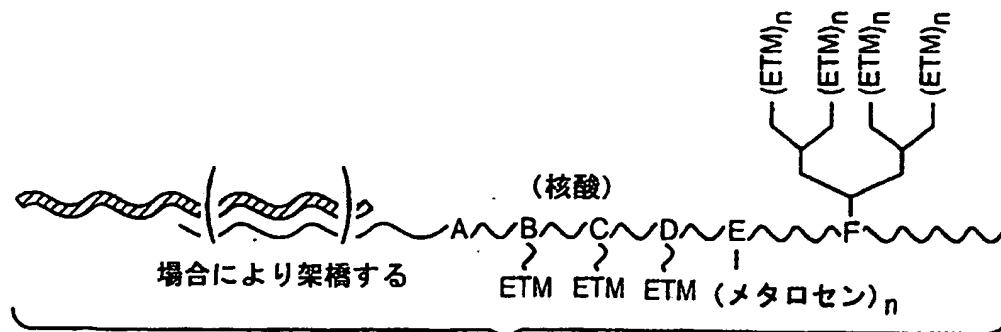


FIG. 7C

【図7D】

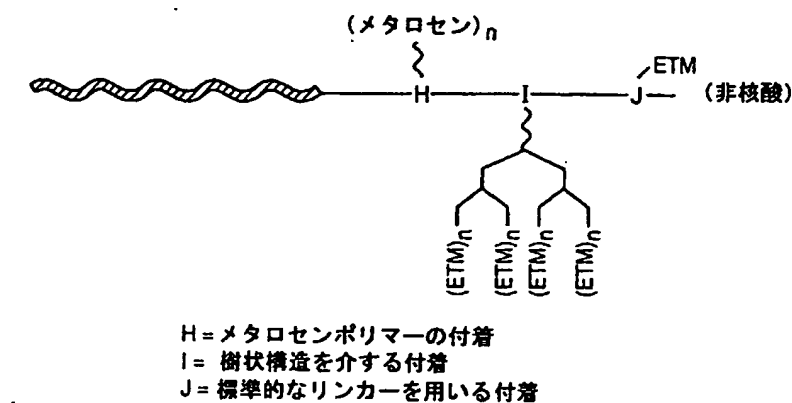


FIG. 7D

【図7E】

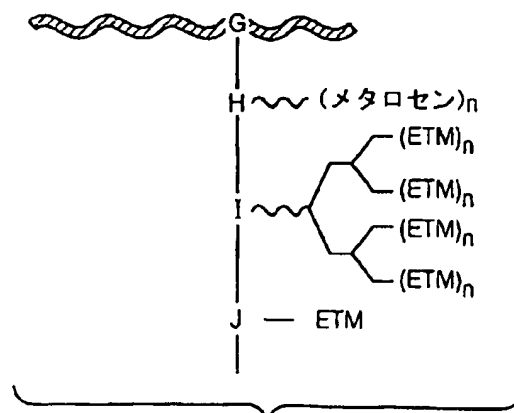


FIG. 7E

【図 8 A】

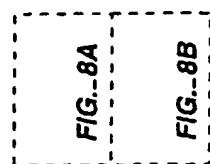
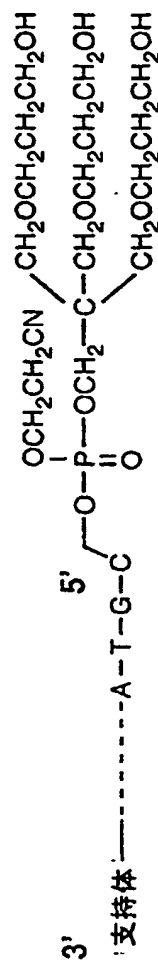
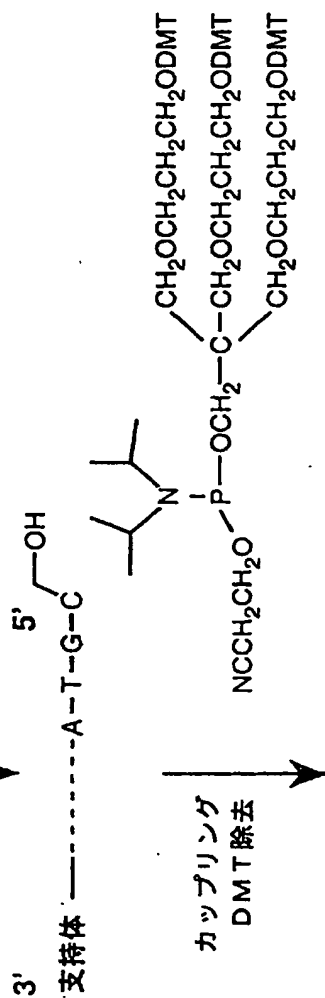


FIG. 8A

FIG. 8A

標準的なDNA合成



このカップリング法を、
繰り返すことができる



【図9A】

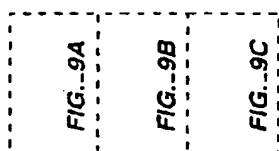
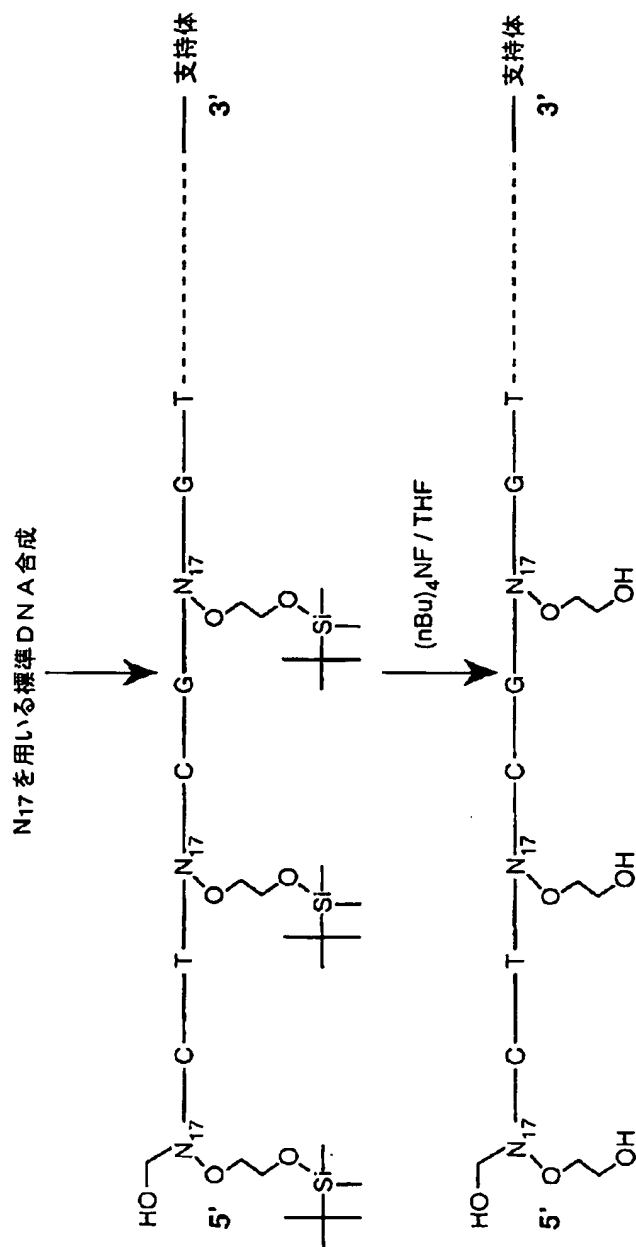


FIG. 9

FIG. 9A



【図 9 B】

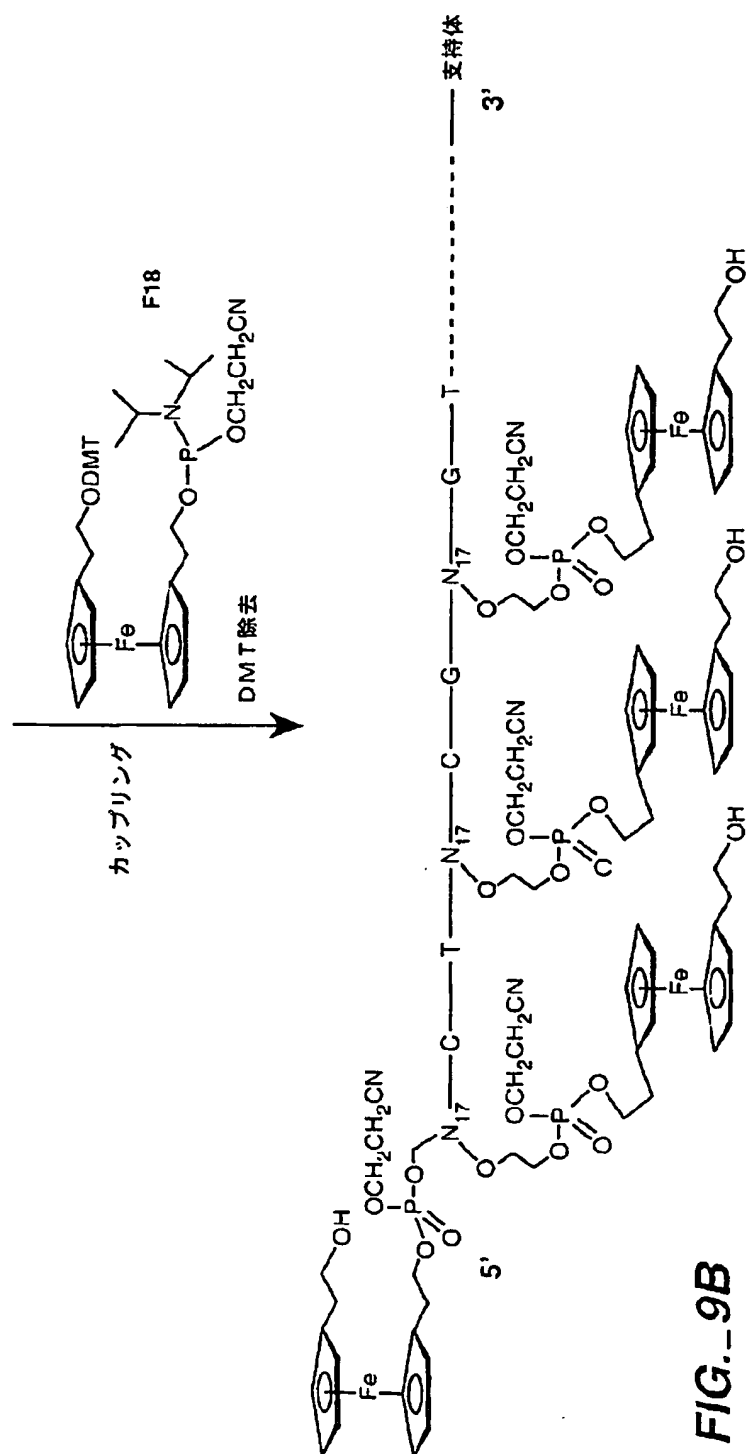
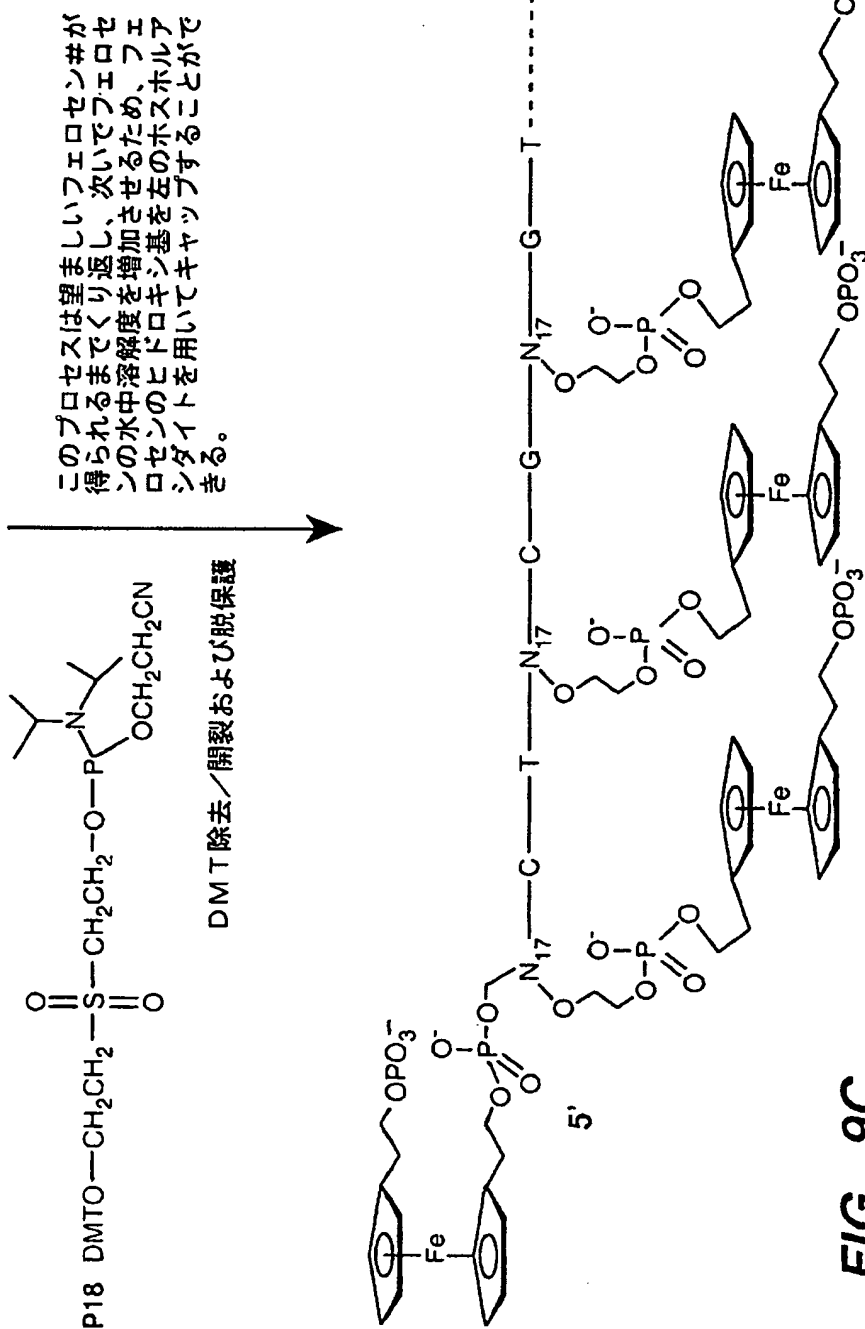


FIG. 9B

【図9C】



【図10】

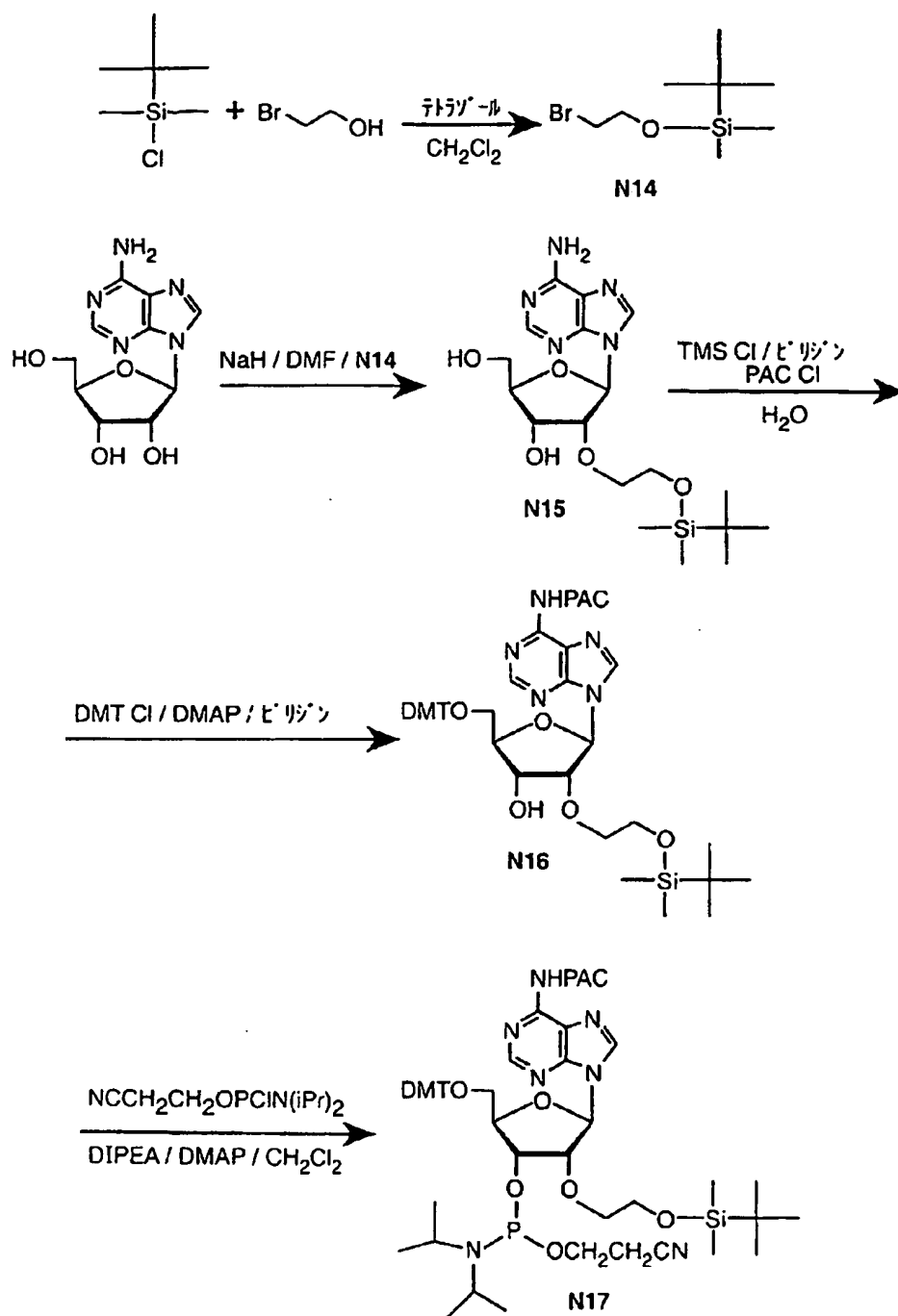


FIG. 10

【図 11】

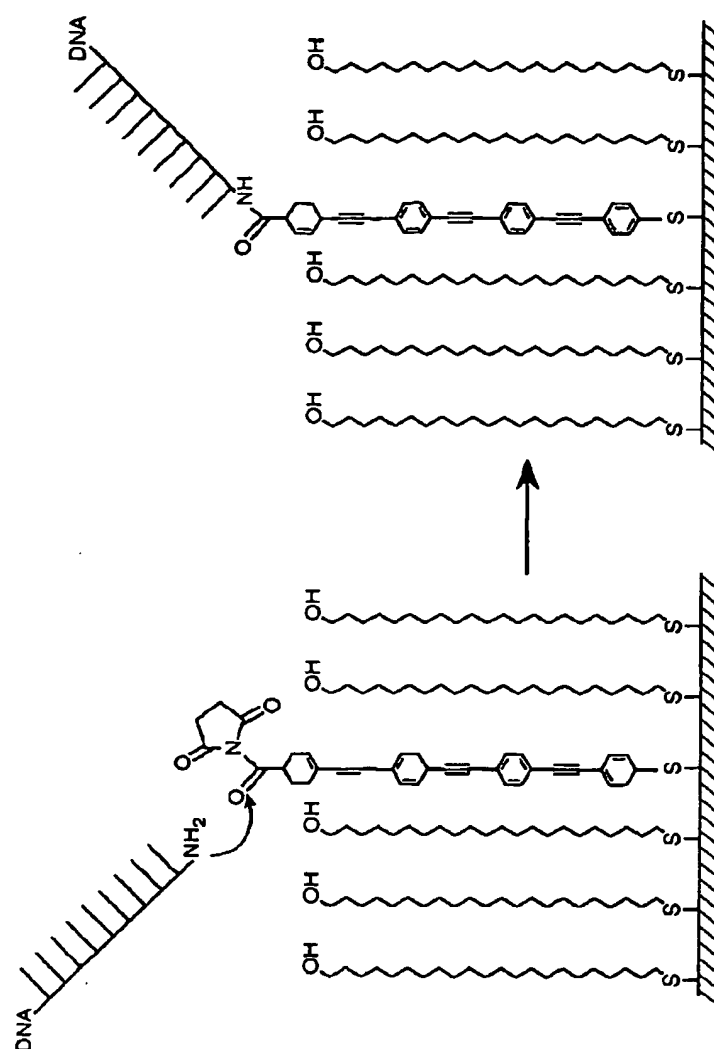


FIG._11

【図 12】

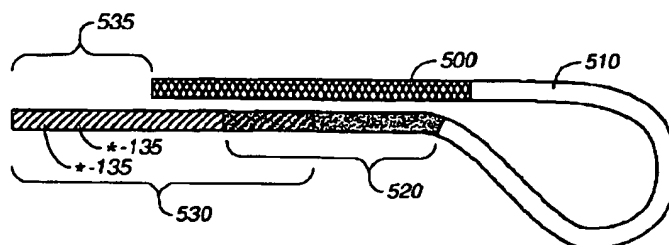
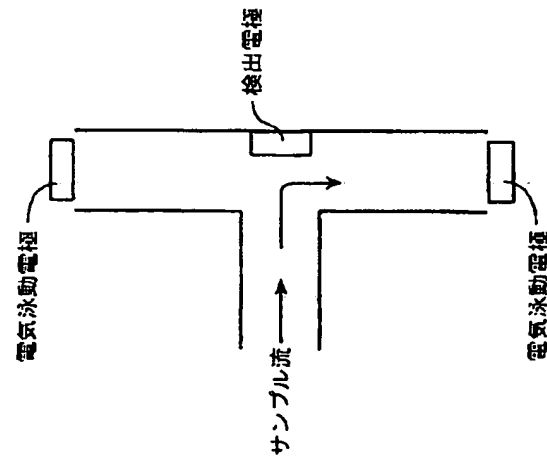
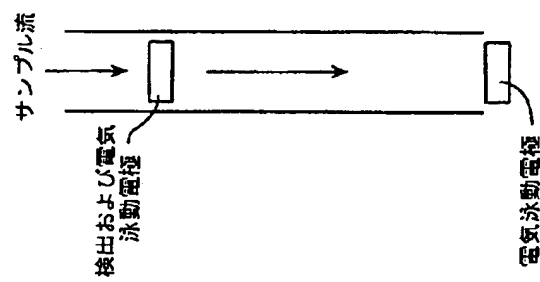


FIG._12

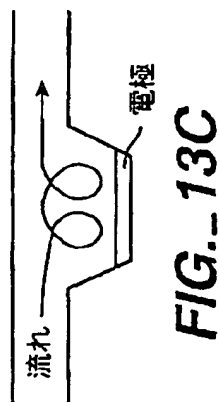
【図13A】



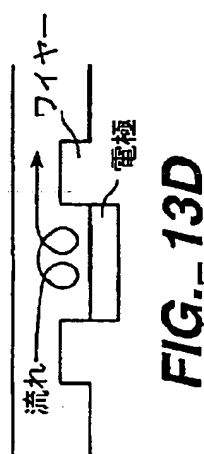
【図13B】



【図13C】



【図13D】



【図14】

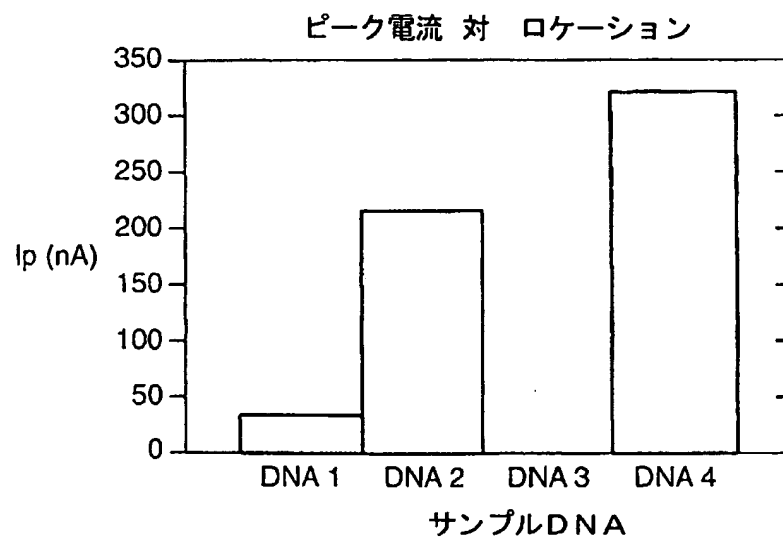
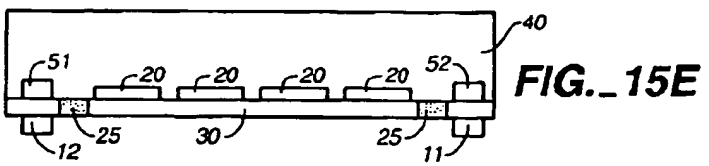
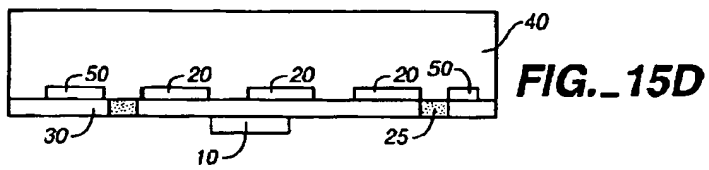
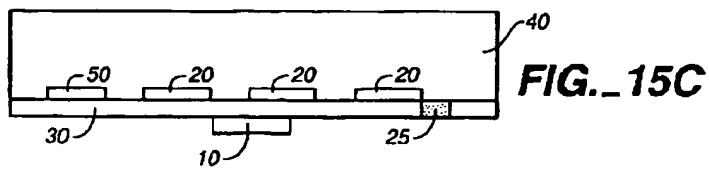
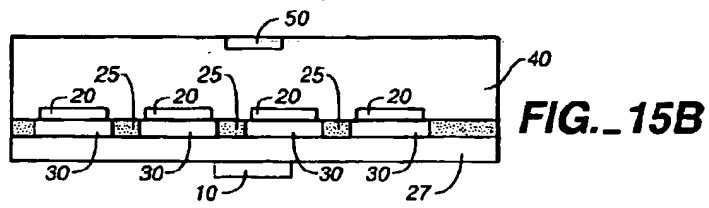
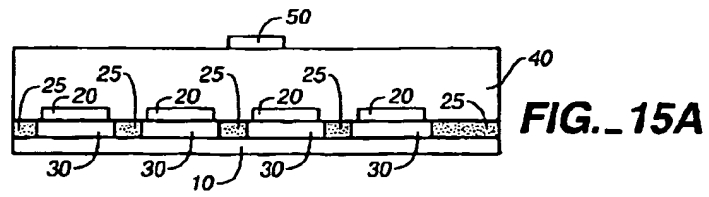
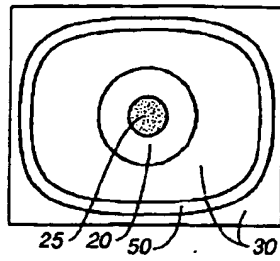
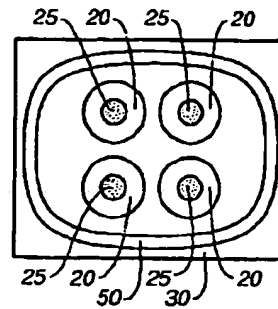


FIG. 14

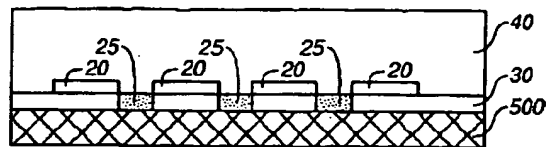
【図15A-E】



【図15F・G】

**FIG. 15F****FIG. 15G**

【図16A】

**FIG. 16A**

【図16B】

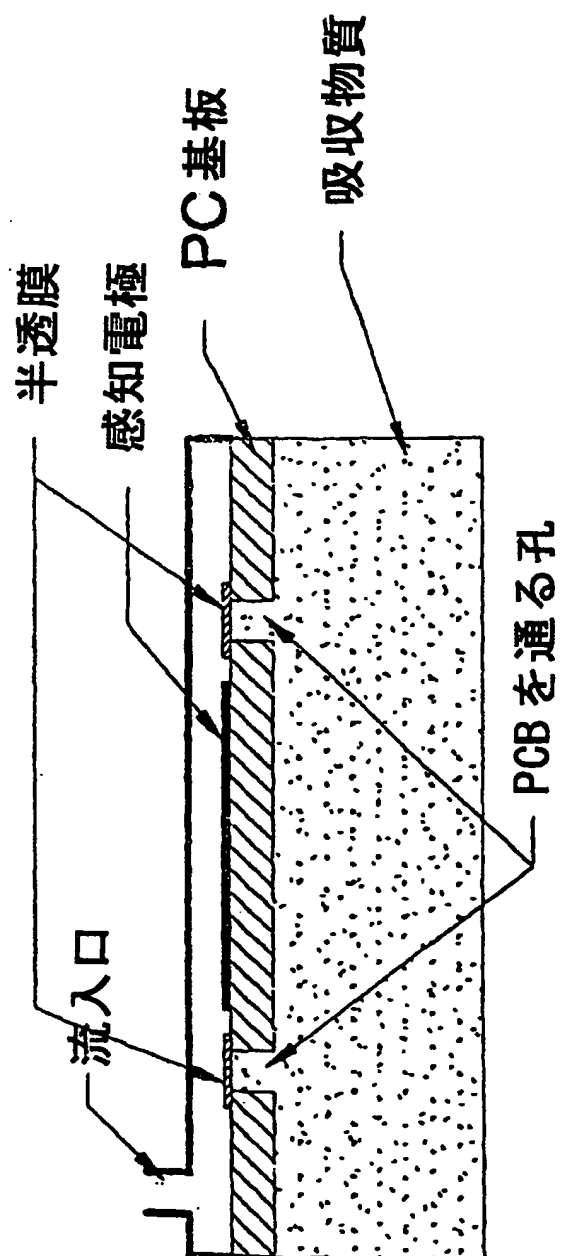


Fig. 2 16B

【図16C】

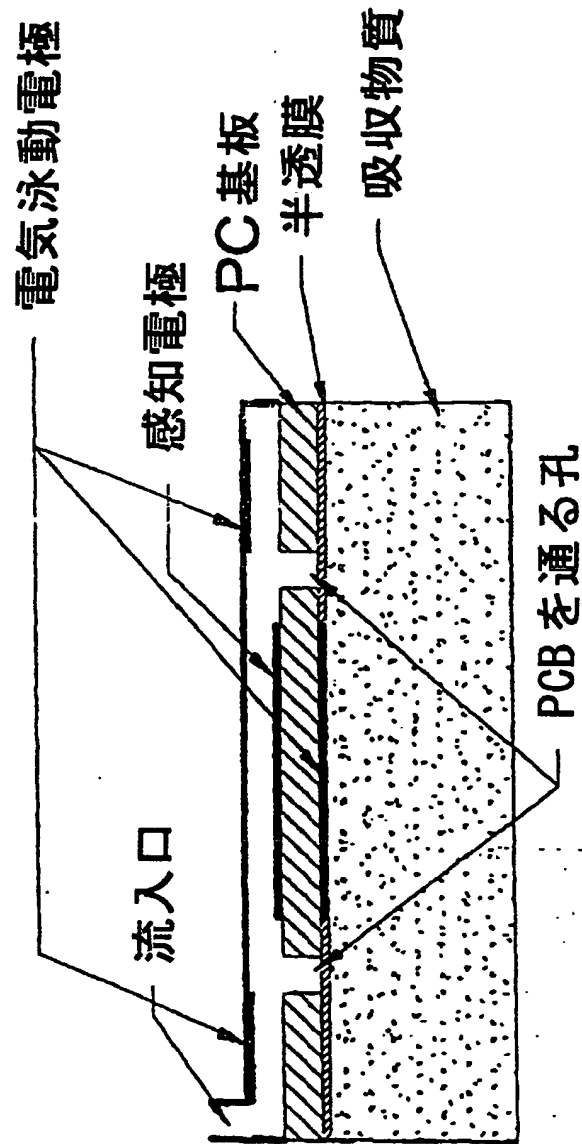


Fig. 3 16C

【図16D】

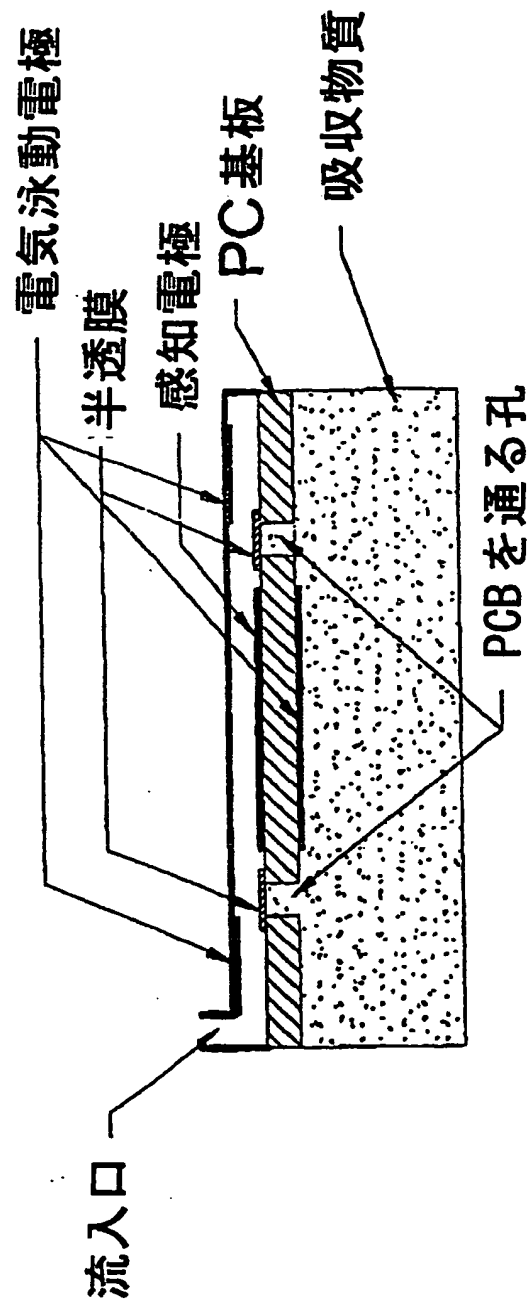


Fig. 4

16D

【図16E】

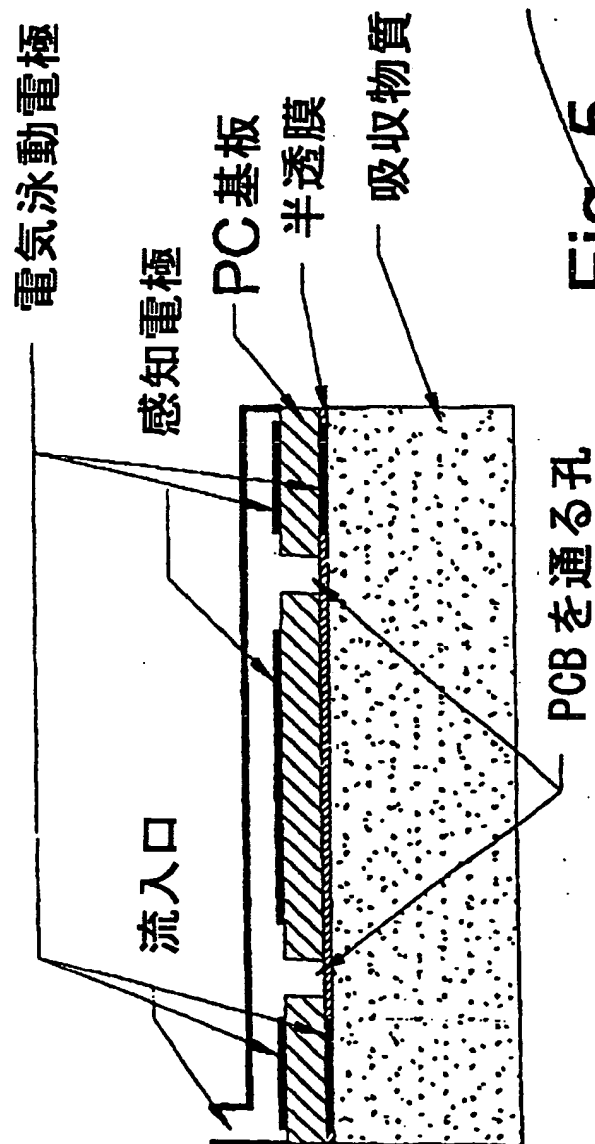


Fig. 5

16E

【図16F】

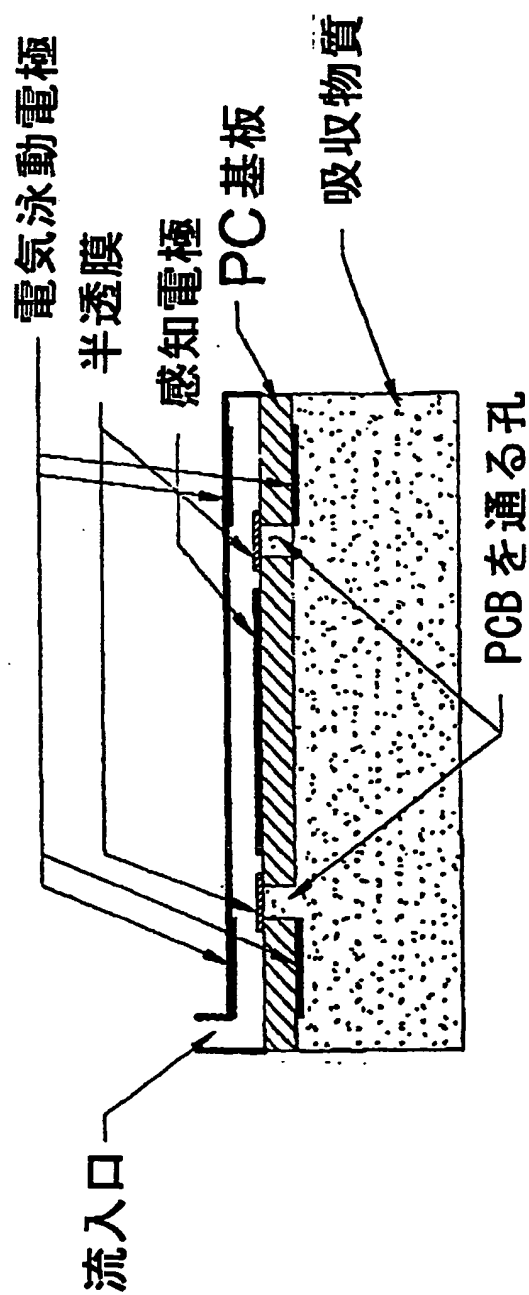


Fig. 6

Fig 16F

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 00/31233A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 601N33/543 C12Q1/68 G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 601N C12Q 801L 801J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 67425 A (CLINICAL MICRO SENSORS INC) 29 December 1999 (1999-12-29) claims 1-12	1-9
X	WO 99 29711 A (NANOGEN INC) 17 June 1999 (1999-06-17)	1-9
Y	claim 5 page 17, line 21 - line 23 page 72, line 20 - line 21	1-9
Y	US 5 632 957 A (TU EUGENE ET AL) 27 May 1997 (1997-05-27) cited in the application column 19, line 15 - line 16 column 19, line 37 - line 40	1-9

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier documents but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)
- *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2001

Date of meeting of the international search report

04/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5018 Patentplan 2
NL - 2260 HW Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 630 N.
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT, 15 00/31233

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
Y	WO 99 57319 A (YU CHANGYUN ; BAMDAD CYNTHIA (US); CLINICAL MICRO SENSORS INC (US)) 11 November 1999 (1999-11-11) cited in the application claims 1-38	1-9
A	US 4 787 963 A (MACCONNELL WILLIAM P) 29 November 1988 (1988-11-29) abstract	1-9
A	WO 98 51823 A (MOSAIC TECHNOLOGIES ; ABRAMS EZRA S (US); HUIR ANDREW R (US); BOLES) 19 November 1998 (1998-11-19) page 24, line 4 - line 29; claim 1	1-9
A	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ; BARANY GEORGE (US); KEMPE MARCIA (US); ZIRVI MONIB (US)) 28 August 1997 (1997-08-28) page 23, line 3 - line 11	1-9

Form PCT/ISA/210 (continuation of record sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT, US 00/31233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9967425 A	29-12-1999	AU 4709999 A EP 1090145 A	10-01-2000 11-04-2001
WO 9929711 A	17-06-1999	US 6051380 A AU 1706999 A BR 9814257 A CN 1284082 T EP 1036085 A US 6187642 B	18-04-2000 28-06-1999 03-10-2000 14-02-2001 20-09-2000 13-02-2001
US 5632957 A	27-05-1997	US 6017696 A US 5605662 A AU 702773 B AU 3507095 A BR 9508908 A CN 1164894 A EP 0871888 A FI 970957 A JP 10505497 T US 6099803 A WO 9607917 A US 6068818 A US 6225059 B US 6187642 B US 5849486 A US 6048690 A US 6051380 A AU 708677 B AU 2966195 A BR 9506035 A CA 2169852 A CN 1135220 A EP 0717749 A FI 961034 A JP 9503307 T NZ 289731 A WO 9601836 A US 6238624 B AU 692800 B AU 8125794 A AU 8522798 A AU 8522898 A BR 9407952 A CA 2175483 A CN 1141078 A EP 0727045 A FI 961843 A JP 9504910 T NZ 275962 A WO 9512808 A US 5929208 A	25-01-2000 25-02-1997 04-03-1999 27-03-1996 28-10-1997 12-11-1997 21-10-1998 07-05-1997 02-06-1998 08-08-2000 14-03-1996 30-05-2000 01-05-2001 13-02-2001 15-12-1998 11-04-2000 18-04-2000 12-08-1999 09-02-1996 14-10-1997 25-01-1996 06-11-1996 26-06-1996 02-05-1996 31-03-1997 24-09-1998 25-01-1996 29-05-2001 18-06-1998 23-05-1995 10-12-1998 10-12-1998 26-11-1996 11-05-1995 22-01-1997 21-08-1996 20-06-1996 13-05-1997 28-07-1998 11-05-1995 27-07-1999
WO 9957319 A	11-11-1999	AU 2473599 A AU 2473799 A EP 1075541 A EP 1051517 A WO 9937819 A AU 4072599 A	23-11-1999 09-08-1999 14-02-2001 15-11-2000 29-07-1999 23-11-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/31233

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957319 A		EP 1075549 A WO 9957317 A	14-02-2001 11-11-1999
US 4787963 A	29-11-1988	NONE	
WO 9851823 A	19-11-1998	AU 730491 B AU 7489498 A EP 0981647 A	08-03-2001 08-12-1998 01-03-2000
WO 9731256 A	28-08-1997	AU 2799797 A CA 2244891 A EP 0920440 A	10-09-1997 28-08-1997 09-06-1999

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド (参考)
G 0 1 N	27/327	G 0 1 N	33/53
	27/416		33/561
	27/447		37/00
	33/483		27/46
// G 0 1 N	33/53		27/30
	33/561		27/46
	37/00		27/26
	1 0 2	C 1 2 N	15/00
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, G M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者	ジョスト・ジー・ビールメッター アメリカ合衆国91107カリフォルニア州バ サディナ、サウス・グリーンウッド・アベ ニュー69番		
(72) 発明者	ジョン・フェイズ・ケイエム アメリカ合衆国91030カリフォルニア州バ サディナ、ブエナ・ビスタ1000番		
F ターム (参考)	2G045 AA40 DA12 DA13 FB05 2G052 AA28 AB20 AD02 AD06 AD22 AD26 AD46 DA08 ED14 GA21 GA30 4B024 AA11 AA19 CA01 HA12 4B029 AA07 AA23 BB20 FA15 4B063 QA01 QQ42 QR08 QR43 QR56 QS25 QS34 QS39 QX02		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.